

CLAUDIA MARIA BRANCO DE FREITAS MAIA

**ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM DA SERRAGEM
DE *Pinus taeda* PELAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS
DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM FORMAÇÃO**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso
de Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas da Universidade Federal
do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salvio
Mangrich

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Simonelli

CURITIBA

2003

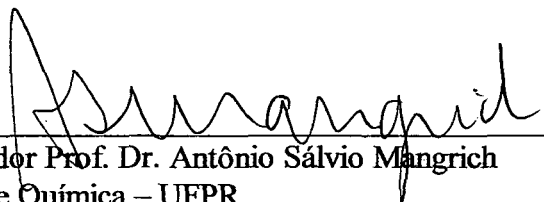
TERMO DE APROVAÇÃO

**ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE COMPOSTAGEM DA SERRAGEM DE *PINUS*
TAEDA PELAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DAS
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM FORMAÇÃO**

por

CLAUDIA MARIA BRANCO DE FREITAS MAIA

Tese aprovada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:



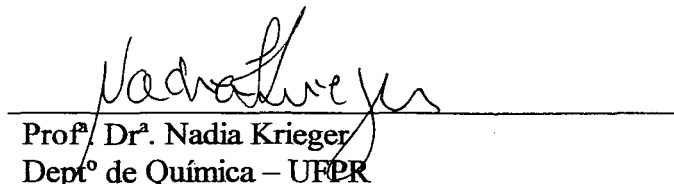
Orientador Prof. Dr. Antônio Sálvio Mangrich
Deptº de Química – UFPR



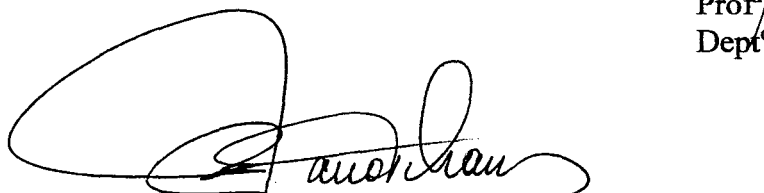
Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa
Deptº de Química - UEM



Dr. Etelvino Henrique Novotny
EMBRAPA - Sete Lagoas/MG



Profª. Drª. Nadia Krieger
Deptº de Química – UFPR



Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
Deptº de Química – UFPR

Curitiba, 15 de dezembro de 2003.

Aos meus filhos Pedro e Geórgia, com amor, dedico.

Lo que nace conmigo

Pablo Neruda

*Canto a la hierba que nace conmigo
En este instante libre, a los fermentos
Del queso, del vinagre, a la secreta
Floración del primer semen, canto
Al canto de la leche que ahora cae
De blancura en blancura a los pezones,
Canto a los crecimientos del establo,
Al fresco estiércol de las grandes vacas
De cuyo aroma vuelan muchedumbres
De alas azules, hablo
Sin transición de lo que ahora sucede
Al abejorro con su miel, al liquen
Con sus germinaciones silenciosas:
Como un tambor eterno
Suenan las sucesiones, el transcurso
De ser a ser, y nazco, nazco, nazco
Con lo que está naciendo, estoy unido
Al crecimiento, al sordo alrededor
De cuanto me rodea, pululando,
Propagándose en densas humedades,
En estambres, en tigres, en jaleas.*

*Yo pertenezco a la fecundidad
Y creceré mientras crecen las vidas:
Soy joven con la juventud del agua,
Soy lento con la lentitud del tiempo,
Soy puro con la pureza del aire,
Oscuro con el vino de la noche
Y sólo estaré inmóvil cuando sea
Tan mineral que no vea ni escuche,
Ni participe en lo que nace y crece.
Cuando escogí la selva
Para aprender a ser,
Hoja por hoja,
Extendí mis lecciones
Y aprendí a ser raíz, barro profundo,
Tierra callada, noche cristalina,
Y poco a poco más, toda la selva.*

It has become clear that the keyword of supramolecular chemistry is not structure but information. Thus, supramolecular chemistry is leading the way towards apprehending chemistry as an *information science*.

Jean Marie Lehn, 1995

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas a quem devo agradecer por tornarem possível a realização deste trabalho. Incluo aqueles que porventura não tenham sido aqui citados. Gostaria de mencionar particularmente alguns nomes a quem devo especial gratidão.

Ao Professor Doutor Antonio Salvio Mangrich pela orientação dos trabalhos, pelo exemplo e pelo incentivo. Ao “Professor” agradeço muito mais do que a orientação acadêmica. Agradeço pelo otimismo, pela vivacidade, pela solidariedade e amizade que doava a seus alunos, entre os quais me incluo, durante estes quatro anos em que convivemos. Agradeço por sua postura de verdadeiro professor, ao fazer de cada pergunta a oportunidade de uma aula, ainda que seus desenhos dos níveis de energias das transições eletrônicas nunca saíssem do tamanho certo. Muito obrigada , Professor.

Ao Professor Doutor Fábio Simonelli pela co-orientação, pelo apoio e pela valiosa colaboração junto ao instrumental do Laboratório de Síntese.

Ao Dr. Willian Ferreira da Costa e ao Dr. Etelvino Henrique Novotny por gentilmente participarem da Banca Examinadora e pela valiosa contribuição a este trabalho.

Aos Professores do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, especialmente aos Professores Doutores Marco Tadeu Grassi, Nádia Krieger e Alfredo Ricardo Marques de Oliveira pela grande contribuição prestada ao meu trabalho e pela gentileza em participar nas Bancas Examinadoras de Qualificação e Defesa deste doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Projetos e Processo Ambientais, Ademar, Betânia, Cristiane, Elisete, Fabinho, Júlio, Kátia, Lenise, Ronaldo, Ronei, Rodrigo e Tatiane pela amizade, apoio e pelos momentos divertidos que passamos juntos.

Agradeço muito ao Professor Alessandro Piccolo pelo privilégio de sua orientação e pelo carinhoso e inestimável apoio com que me recebeu em Portici. Gostaria de agradecer também com muito carinho, a todos os amigos do Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, e dell'Ambiente da Università di Napoli Federico II, em Portici, Itália, onde tive a oportunidade de saborear a melhor pizza e a pior cerveja de toda minha vida (stò scherzando!). Agradeço especialmente ao Dr. Pellegrino Conte por sua grande ajuda e presteza com que resolvia todos, pequenos e grandes, os problemas no dia-a-dia do

laboratório. Valeu Rino! Obrigada também à Anna Agretto, Gabriela Fiorentino (a “Gabi”), Melina Riccio e Ricardo “Rick” Spaccini pela solidariedade e pelo presente de suas amizades. Grazzie a tutti!

Durante minha estada na Itália, conheci uma pessoa a quem eu gostaria de fazer um agradecimento especial: à Daniela Šmejkalová, a “Danča”, não só pela grande amizade e pelos momentos mais engraçados que passei na Itália, mas também pela grande colaboração com o amadurecimento do meu trabalho, a partir das longas discussões dos nossos resultados. Obrigada Danča!

E aqui agradeço à CAPES pela bolsa sanduíche e à Embrapa pela passagem aérea cedida à minha filha Geórgia, sem a qual não teria sido possível concretizar o doutorado sanduíche. À Embrapa obrigada também pelo apoio nos trabalhos experimentais.

À Tibagi Ambiental pelo uso da Usina de Compostagem em São José dos Pinhais, PR e ao Programa Paraná 12 Meses pelo apoio financeiro do projeto de tese.

Por fim agradeço à minha família, especialmente à meus filhos pelo carinho, apoio e compreensão de tudo aquilo que a realização deste trabalho os privou e de tudo aquilo que o mesmo representará em minha vida profissional. Acima de tudo, agradeço a eles pelo amor que compartilham comigo.

E a Deus por tudo isso somado e multiplicado...

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTAS DE TABELAS	iii
LISTAS DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. COMPOSTAGEM	3
2.2. HÚMUS E HUMIFICAÇÃO	6
2.3. CLASSIFICAÇÃO E FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	7
2.4. A TEORIA SUPRAMOLECULAR DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	14
2.5. A ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	17
2.5.1. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	18
2.5.1.1. Ressonância magnética nuclear de carbono treze	18
2.5.1.2. Espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de UV-Vis	20
2.5.1.3. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica	21
2.5.2. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	22
2.5.2.1. Cálculo das massas molares de substâncias húmicas	25
2.5.2.2. Preparo de amostras húmicas para cromatografia de exclusão	28
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. MATERIAL DE PARTIDA	31
4.2. COMPOSTAGEM	31
4.3. EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES HÚMICAS	33
4.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DAS FRAÇÕES HÚMICAS	35
4.4.1. EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS	39
4.4.1.1. Efeito do tempo de compostagem sobre a conformação de substâncias húmicas	39
4.4.1.2. Efeito do pH sobre a estrutura conformacional das substâncias húmicas	39
4.4.1.3. Efeito da concentração sobre a estrutura conformacional de substâncias húmicas.	39
4.4.1.4. Efeito do contra-íon sobre a estrutura conformacional de humatos	39
4.4.2. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LODO BIOLÓGICO	41

5.1.1.	RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	41
5.1.2.	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	44
5.1.3.	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E ULTRAVIOLETA-VISÍVEL.....	45
5.2.	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DURANTE A COMPOSTAGEM.....	49
5.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DO COMPOSTO PELO MÉTODO PIROFOSFATO/NaOH	56
5.3.1.	RENDIMENTO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DO COMPOSTO	56
5.3.2.	ANÁLISE ELEMENTAR DAS FRAÇÕES HÚMICAS	56
5.3.3.	ANÁLISE DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA (DRIFT) DAS FRAÇÕES ÁCIDO HÚMICO, ÁCIDO FÚLVICO E HUMINA	58
5.3.4.	ANÁLISE POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DAS FRAÇÕES ÁCIDO HÚMICO, ÁCIDO FÚLVICO E HUMINA	63
5.3.5.	CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	73
5.3.5.1.	<i>Efeito da compostagem sobre a conformação de substâncias húmicas.</i>	74
5.3.5.2.	<i>Efeito do pH sobre a estrutura conformacional de substâncias húmicas.</i>	78
5.3.5.3.	<i>Efeito da concentração de substâncias húmicas sobre suas estruturas conformacionais...</i>	79
5.3.5.4.	<i>Efeito do contra-íon na estrutura conformacional de humatos</i>	86
6.	CONCLUSÕES.....	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXO I.	ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO TREZE	
ANEXO II.	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO EXPANDIDOS	
ANEXO III.	ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO	

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 -	TEORES DE CARBONO TOTAL (C) E NITROGÊNIO KJEHDAL (N) DE SERRAGENS PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE RESERVA, PARANÁ.	5
TABELA 2 -	PARÂMETROS ESPECTRAIS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS, ÁCIDO HÚMICO (AH), HUMINA (HU) E LODO (LO).	41
TABELA 3 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H E DE ^{13}C (EM PPM) DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO LODO.	44
TABELA 4 -	INTENSIDADES RELATIVAS (%) DOS GRUPOS FUNCIONAIS DE AH DE COMPOSTO AO LONGO DA COMPOSTAGEM.	52
TABELA 5 -	ANÁLISE ELEMENTAR DAS AMOSTRAS DE AH DURANTE A COMPOSTAGEM.	54
TABELA 6 -	RAZÃO E_4/E_6 (RAZÃO ENTRE AS ABSORBÂNCIAS A 465 E 665 NM) DAS AMOSTRAS DE AH AO LONGO DA COMPOSTAGEM.	55
TABELA 7 -	RENDIMENTOS PERCENTUAIS DAS FRAÇÕES HÚMICAS EM COMPOSTO LODO-SERRAGEM EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	56
TABELA 8 -	TEORES DE C, H, N E O+S (%) DAS FRAÇÕES HÚMICAS DE COMPOSTO SERRAGEM – LODO, EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	57
TABELA 9 -	RAZÕES ATÔMICAS H/C, N/C E O/C DAS FRAÇÕES HÚMICAS DE COMPOSTO SERRAGEM – LODO, AO LONGO DA COMPOSTAGEM.	57
TABELA 10 -	PARÂMETROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DAS FRAÇÕES HÚMICAS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	63
TABELA 11 -	M_w (DETERMINADOS POR SISTEMA HPSEC UV-IR) DE HUMATOS SOLUBILIZADOS ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) EM TAMPÃO FOSFATO EM PH 7 E EM SOLUÇÃO FOSFATO E ÁCIDO ACÉTICO, EM PH 4,5.	87
TABELA 12 -	MASSA MOLAR MÉDIA (M_w) DE HUMATOS (2 g L^{-1}) EM TAMPÃO FOSFATO, A PH 7, E EM SOLUÇÃO FOSFATO E ÁCIDO ACÉTICO, A PH 4,5, EM SISTEMA HPSEC UV-F.	88

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESQUEMA PROPOSTO PARA A REAÇÃO DE MAILLARD ATRAVÉS DO REARRANJO DE AMADORI [18].	8
FIGURA 2 -	MODELO DE ÁCIDO HÚMICO ADAPTADO DE STEVENSON [14]:	10
FIGURA 3 -	MODELOS CONCEITUAIS DE AGREGADOS HÚMICOS [23]:	13
FIGURA 4 -	ESQUEMA DA COMPLEXAÇÃO DE Fe^{2+} - TRIS (BIPÍRIDINA) COM $FeCl_2$ PRIMEIRAMENTE, SEGUIDA DA TITULAÇÃO COM SOLUÇÃO DE $FeCl_3$, PRODUZINDO A ESTRUTURA TRINUCLEAR [30].	17
FIGURA 5 -	SISTEMA DE CONVERSÃO QUINONA-SEMIQUINONAS POR OXIDAÇÃO - REDUÇÃO DE <i>ORTO</i> - E <i>PARA</i> -QUINONAS [40].	21
FIGURA 6 - -	ESQUEMA DE UMA SEPARAÇÃO DE POLÍMEROS DE BAIXA (•) E ALTA (●) MASSA MOLAR, POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO:	23
FIGURA 7 -	PERFIL DE ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE AMOSTRAS LINEARES E RAMIFICADAS COM VOLUMES HIDRODINÂMICOS (V) SEMELHANTES, MAS DIFERENTES MASSAS MOLARES (M) [55].	24
FIGURA 8 -	ESQUEMA DO PROCESSO KNEER EMPREGADO NA COMPOSTAGEM DA MISTURA LODO-SERRAGEM.	32
FIGURA 9 -	VISTAS DOS REATORES DE COMPOSTAGEM COM O SISTEMA DE AERAÇÃO, NA TIBAGI AMBIENTAL, SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR.	32
FIGURA 10 -	CROMATOGRAMAS DA MISTURA DE PADRÕES DE POLIESTIRENOSULFONATOS DISSOLVIDA EM TAMPÃO FOSFATO PH 7 E EM SOLUÇÃO FOSFATO COM ÁCIDO ACÉTICO E PH 3,5 - SINAIS DO DETECTOR UV-VIS E DO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.	38
FIGURA 11 -	ESPECTRO DE RPE DOS EXTRATOS ORGÂNICOS A 77 K, A 5000 G: HEXANO (A), ACETATO DE ETILA (B), ACETONA (C) E ETANOL (D).	42
FIGURA 12 -	ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DAS AMOSTRAS LODO (A), HUMINA, (B) E ÁCIDO HÚMICO (C) (~300 K) A 5000 G.	43

FIGURA 13 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO LO: HEXANO (A), ACETATO DE ETILA (B), ACETONA (C) E ETANOL (D) EM PASTILHA DE KBR.	45
FIGURA 14 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDO DO LODO EM PASTILHA DE KBR	46
FIGURA 15 - ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO LO: HEXANO (A), ACETATO DE ETILA (B), ACETONA (C) E ETANOL (D).	47
FIGURA 16 - VARIAÇÃO DA TEMPERATURA, DAS CONCENTRAÇÕES RELATIVAS DE Fe^{3+} E DE PORFIRINAS DE Cu^{2+} E DO NÚMERO DE SPIN/G EM AH DO COMPOSTO, EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	49
FIGURA 17 - ESPECTROS NORMALIZADOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DE AH EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	50
FIGURA 18 - ESPECTROS NORMALIZADOS DE INFRAVERMELHO DE ÁCIDOS HÚMICOS, EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	51
FIGURA 19 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C NO ESTADO SÓLIDO (CPMAS) DE AH A DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	53
FIGURA 20 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (DRIFT) DE AF DE COMPOSTO EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	60
FIGURA 21 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (DRIFT) DE AH DE COMPOSTO EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	61
FIGURA 22 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (DRIFT) DE HU DE COMPOSTO EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	62
FIGURA 23 - TEOR DE RADICAIS LIVRES ORGÂNICOS NAS FRAÇÕES HÚMICAS AH, AF E HU EXTRAÍDAS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM A DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.	64
FIGURA 24 - POSSÍVEIS REAÇÕES DE ACOPLAMENTO ENTRE RADICAIS LIVRES GERADOS DURANTE A TRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO 4-HIDROXI-1,3-DIBENZÓICO MEDIADA POR FENOLOXIDASES [20].	66

- FIGURA 25 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DA FRAÇÃO ÁCIDO FÚLVICO (AMOSTRA SÓLIDA) EM 5000 G, (A) À TEMPERATURA AMBIENTE E (B) À 77° K. 68
- FIGURA 26 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DA FRAÇÃO ÁCIDO HÚMICO (AMOSTRA SÓLIDA) EM 5000 G, (A) À TEMPERATURA AMBIENTE E (B) À 77° K. 69
- FIGURA 27 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DA FRAÇÃO HUMINA (AMOSTRA SÓLIDA) EM 5000 G, (A) À TEMPERATURA AMBIENTE E (B) À 77° K. 70
- FIGURA 28 - ESPECTRO EXPERIMENTAL DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DE AMOSTRA DE ÁCIDO FÚLVICO OBTIDO À 77 K E ESPECTRO SIMULADO COM UM NÚCLEO DE COBRE, UM NÚCLEO DE MANGANÊS E COM SINAL DE RADICAL LIVRE ORGÂNICO (RLO). 72
- FIGURA 29 - TEMPO DE RETENÇÃO (MINUTOS) DE POLIESTIRENOSSULFONATOS DE DIFERENTES TAMANHOS MOLECULARES OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO COM DETECTOR DE UV-VIS. 73
- FIGURA 30 - PARÂMETROS DE HPSEC (UV-IR) M_w (DA), POLIDISPERSÃO (P) E ÁREA SOB O PICO ($\times 10^7$) DE HUMATOS DE SÓDIO OBTIDOS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM. 74
- FIGURA 31 - PARÂMETROS DE HPSEC, M_w , POLIDISPERSÃO (P) E ÁREA SOB OS PICOS ($\times 10^7$) DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM A DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM. 75
- FIGURA 32 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) E RELAÇÃO OXIGÊNIO/CARBONO (O/C) DE ÁCIDOS FÚLVICOS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM. 76
- FIGURA 33 - CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS VALORES DE M_w E RELAÇÃO O/C DE ÁCIDOS FÚLVICOS AO LONGO DA COMPOSTAGEM. 77
- FIGURA 34- TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) DE ÁCIDOS FÚLVICOS À CONCENTRAÇÃO DE 0,2 G L⁻¹ (HPSEC UV-IR) E À 2 G L⁻¹ (HPSEC UV-F), EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.. 77

- FIGURA 35 - PARÂMETROS DE HPSEC M_w (DA), POLIDISPERSIDADE (P) E ÁREA SOB OS PICOS ($\times 10^7$) DE HUMATOS DE SÓDIO OBTIDOS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM SOLUBILIZADOS EM DIFERENTES VALORES DE pH (4,5 E 7). 79
- FIGURA 36 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE LODO BIOLÓGICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7. 80
- FIGURA 37 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_n) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS FÚLVICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7. 81
- FIGURA 38 - POLIDISPERSIDADE ESTIMADA POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE LODO BIOLÓGICO EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7. 82
- FIGURA 39 - ÁREA SOB O PICO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPSEC UV-IR, DE ÁCIDOS FÚLVICOS EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7, A DIVERSAS CONCENTRAÇÕES. 82
- FIGURA 40 - TEMPO DE RETENÇÃO (MINUTOS) EM SISTEMA HPSEC UV-IR DE HUMATOS DE SÓDIO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO EM pH 7. 83
- FIGURA 41 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS HÚMICOS OBTIDOS DE LODO BIOLÓGICO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7. 84
- FIGURA 42 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_n) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS HÚMICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO EM pH 7. 84
- FIGURA 43 - POLIDISPERSIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7. 85
- FIGURA 44 - ÁREA SOB O PICO DE CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS HÚMICOS EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO EM pH 7. 86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AF	Ácido Fúlvico
AH	Ácido Húmico
C/N	Carbono/Nitrogênio
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
Da	Unidade de massa definida como 1/12 da massa do isótopo ^{12}C
HPSEC	High Pressure Size Exclusion Chromatography
HU	Humina
IVTF	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
LO	Lodo biológico de fábrica de papel e celulose
M_n	Massa molar ponderada pelo número
MO	Matéria Orgânica
MW	Massa molar média
M_w	Massa molar ponderada pela massa
PEG	Polietileno glicól
PSS	Poliestirenosulfonatos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPE	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica
SEC	Size Exclusion Chromatography
SH	Substâncias Húmicas
UV-vis	Espectroscopia de Ultra-violeta e visível
V_0	Volume de vazios ou Volume morto
V_t	Volume total

RESUMO

A caracterização química de substâncias húmicas (SH) é uma importante etapa na compreensão do processo de humificação. Apesar de seu papel imprescindível na sustentabilidade da vida, a natureza química e a reatividade das SH são ainda pouco conhecidas. SH são misturas originadas da degradação de restos vegetais, do metabolismo-catabolismo microbiano, ou de ambos processos.

A compostagem é um processo biooxidativo de tratamento de resíduos orgânicos que, sob condições controladas, pode servir para o estudo químico detalhado do processo de humificação e da formação de SH, propiciando a formação de um húmus menos heterogêneo e a partir de materiais de partida bem caracterizados quimicamente.

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações químicas ocorridas no material durante a compostagem da mistura de serragem de *Pinus taeda* e lodo biológico de fábrica de celulose de *Pinus*. Este material foi usado para estudar o processo de humificação, através da caracterização espectroscópica e de cromatografia de exclusão por tamanho das frações húmicas.

Os resultados mostraram que o húmus produzido gerou SH de tamanho molecular entre 800 e 12000 Da, ricos em grupos oxigenados (carboxilas e fenóis), em complexos metálicos de ferro, cobre e manganês e em radicais livres orgânicos. A variação do tamanho dos agregados durante a compostagem se relacionou a aspectos como aeração e relação O/C. O índice de oxidação das estruturas parece reger estas relações. Em húmus “jovens”, a fração fúlvica parece ser especialmente afetada por estas relações. O modelo clássico de descrição das SH como macromoléculas poliméricas não explica os resultados obtidos neste trabalho. Estes resultados parecem concordar com a descrição das SH como associações supramoleculares de moléculas relativamente pequenas, unidas por forças fracas em sistema de “self-assembly”, ao invés da descrição destas substâncias como macromoléculas. Forças atrativas hidrófobas e ligações de hidrogênio parecem reger os processos de agregação em soluções diluídas, resultando em agregados de tamanhos moleculares maiores, com o aumento da concentração. A repulsão eletrostática predominante quando um limite crítico de concentração é ultrapassado, faz com que os tamanhos dos agregados moleculares se tornem menores. A interação das SH com espécies anfífilas tais como ácidos orgânicos, parece atuar especialmente desta forma.

ABSTRACT

The chemical characterization of humic substances (HS) is an important step to understand the humification process. Despite their role in the sustainability of life, the basic chemical nature and reactivity of HS are still poorly understood. HS are mixtures developed from plant and animal decays, from microbial metabolism-catabolism, or from both.

Composting is a biooxidative process of organic wastes treatment, which could be used, under specified conditions, for HS formation studies, since it is possible to obtain homogeneous and well chemical well-defined materials.

The aim of this work was to study the chemical alterations during the composting of *Pinus taeda* sawdust and paper mill sludge. The humic fractions obtained from compost were studied by using spectroscopic techniques (EPR, DRIFT, UV-vis and NMR) and size-exclusion chromatography.

The results show that the humus compost formed HS with molecular size between 800 and 12000 Da, rich in oxygenated groups as carboxyl and phenols, in metallic complex as iron, copper and manganese, and in free organic radicals. The molecular size variation of the humic aggregates from compost was correlated with O/C ratio and aeration. In fresh humus, fulvic fraction seems to be specially affected by this parameters. Such results would have been difficult to explain based on the polymeric description of humic substances. Conversely, our findings can be easily explained on the basis of the supramolecular understanding of humic substances that describes these natural materials as heterogeneous and rather small molecules associated by dispersive forces in supramolecular structures. Hydrophobic forces (π - π , CH- π , van der Waals, charge-transfer bonds) and H-bondings seems to rule the aggregation process in diluted solutions, resulting in greater aggregates with the increase of concentration. Electrostatic repulsion predominates when a critical concentration limit is exceeded and as a result, the molecular size becomes smaller. Humic superaggregates interactions with amphiphilic species as organic acids seems might to have such behavior.

1. INTRODUÇÃO

Com o advento do crescimento da população mundial e do desenvolvimento industrial, um dos principais problemas ambientais da atualidade consiste nas imensas quantidades de rejeitos geradas todos os dias em todo o mundo. Entre estes rejeitos, boa parte é constituída de resíduos orgânicos, tais como sobras domésticas, agrícolas ou industriais. Estimativas recentes indicam, por exemplo, que os 15 países membros da União Européia produzem em torno de 1,23 bilhões de toneladas de resíduos orgânicos por ano, sendo que cerca de 90% do total destes rejeitos é derivado da agricultura [1].

O grande volume de resíduos gerados especificamente pelas indústrias de transformação da madeira é um problema comum a praticamente todas as serrarias brasileiras. Embora atualmente empresas modernas incluam em seu planejamento o gerenciamento ambiental da atividade e o aproveitamento integrado de seus subprodutos, a maioria das serrarias instaladas ainda está despreparada para o descarte adequado de seus rejeitos. O sistema de descarte mais utilizado ainda é o depósito a céu aberto em pátios totalmente desprovidos de qualquer controle ambiental.

O processamento primário de espécies de *Pinus* pode gerar de 16 a 20% de serragem, de 7 a 11% de casca e de 35 a 47% de outros resíduos, tais como refilos e destopos [Vianna Neto, 1984 citado por 2]. Estudos detalhados de três serrarias de espécies de *Pinus* em Santa Catarina, demonstraram que o rendimento médio em resíduos de serragem e casca variou de 27 a 39% das toras processadas [2].

Uma vez que os plantios florestais no sul do país seguem sistemas de manejo com pouca ou nenhuma adição de fertilizantes, a incorporação de resíduos orgânicos a estes plantios contribui para formar a matéria orgânica (MO) do solo, cujos principais efeitos benéficos na produtividade agrícola são devidos à melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos. A MO propicia a melhor agregação das partículas minerais, devido à sua ação cimentante e conseqüentemente à redução da densidade aparente, à melhor capacidade de aeração e drenagem, devido ao aumento da porosidade e à maior

capacidade de retenção de umidade. A MO promove o aumento do teor de substâncias húmicas (SH) e o conseqüente aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) potencial do solo, a elevação do pH e o maior poder de tamponamento, favorecendo a atividade microbiana e a liberação gradativa dos nutrientes essenciais às plantas, devido ao poder complexante das SH. A MO possibilita ainda maior atividade biológica, por ser uma fonte de nutrientes e energia aos microrganismos, maior equilíbrio biológico e melhor sanidade do solo e conseqüentemente das plantas, levando finalmente à maior biodiversidade ao solo.

Dada a importância da MO e a gravidade dos problemas ambientais decorrentes do acúmulo de resíduos orgânicos nas indústrias florestais, torna-se cada vez maior o interesse em reciclá-los como fertilizantes ou condicionadores de solo. Do ponto de vista ambiental, o carbono orgânico liberado pela decomposição da biomassa vegetal e da matéria orgânica do solo, entre 1860 e 1980, foi estimado entre 1,8 e $4,7 \times 10^{15}$ g carbono/ano, a mesma ordem de grandeza do carbono liberado de combustíveis fósseis, ou seja, 5×10^{15} g carbono/ano [3]. O retorno dos resíduos orgânicos aos solos e especialmente às florestas é, portanto, uma prática que contribui não somente à manutenção da fertilidade dos solos e conseqüentemente à sustentabilidade agrícola, mas também à imobilização do carbono seja via formação de húmus, seja através de sua fixação na biomassa vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. COMPOSTAGEM

Um dos principais processos de tratamento de rejeitos orgânicos para a produção de fertilizante é a compostagem, um tipo de tratamento biológico usado há milênios e, até hoje, de forma empírica [4]. A compostagem é a solução natural para viabilizar o uso de boa parte dos resíduos orgânicos de origem industrial ou não e apresenta as seguintes vantagens:

- reduz a relação carbono / nitrogênio (C/N) do material original;
- diminui os problemas de imobilização de nitrogênio (N) por microrganismos no solo receptor;
- promove a biodegradação de poluentes, incluindo organoclorados, e de inibidores de crescimento vegetal;
- reduz a relação massa/volume e conseqüentemente diminui os custos de transporte do resíduo tratado;
- elimina odores indesejáveis, oriundos de processos anaeróbios;
- possibilita altas taxas de aplicação do resíduo no solo;
- aumenta os componentes húmicos e a CTC, melhorando a retenção e disponibilidade de nutrientes em comparação com o material de partida.

A compostagem pode ser definida como um processo de biooxidação exotérmico de um substrato orgânico heterogêneo no estado sólido, resultante da ação rápida, dinâmica e sucessiva de populações de microrganismos aeróbios [4,5]. Este processo é caracterizado pela produção de dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e amônia (NH_3), liberação de substâncias minerais e formação de matéria orgânica estabilizada. A compostagem elimina

características indesejáveis do material orgânico, transformando-o em composto, um insumo agrícola livre de microrganismos patogênicos e fácil de manipular [4,5].

Os sistemas de compostagem podem ser classificados em dois tipos:

- sistemas abertos: são os sistemas mais comuns e de menor custo e o material a ser compostado é colocado em pilhas ou leiras de seção transversal geralmente triangular, com altura entre 1,5 a 1,8 m e 4,0 a 4,5 m de base [4]. A aeração nos sistemas abertos pode ser feita por reviramento mecânico ou manual das leiras ou ainda por aeração forçada por injeção de ar sob as leiras estáticas;
- sistemas fechados ou reatores biológicos: possibilita o maior controle dos parâmetros que afetam a velocidade de compostagem, reduzindo o tempo da fase termófila e acelerando o processo. São sistemas porém, de maior custo inicial de instalação e de menor flexibilidade operacional para tratamentos de volumes variáveis de resíduos [4].

Os diversos componentes da matéria orgânica apresentam diferenças quanto à suscetibilidade à degradação, sendo que componentes como açúcares e proteínas são rapidamente degradados, enquanto que componentes como a celulose e a lignina degradam-se mais lentamente. Nas etapas iniciais do processo, ocorre o forte desenvolvimento de microrganismos mesófilos, capazes de consumir os componentes prontamente degradáveis. Com a elevação gradativa da temperatura, resultante da atividade biológica, a população de mesófilos diminui e é substituída por microrganismos termófilos. Nesta etapa, a temperatura atinge valores superiores a 70° C, permanecendo acima de 55° C por pelo menos 3 dias, assegurando a higienização do material, a destruição dos microrganismos patogênicos e de sementes de ervas daninhas. Esta fase é chamada ativa ou termófila e é caracterizada por intensa atividade microbiana a qual assegura a estabilidade da MO e reduz a fitotoxicidade do material através da degradação de substâncias com potencial tóxico [5].

Uma vez que o substrato orgânico foi em sua maior parte transformado, a população de microrganismos termófilos e a temperatura diminuem, propiciando que a população de mesófilos se instale novamente. Nesta fase, a maioria das moléculas

facilmente degradáveis foram consumidas e o composto entra em fase de maturação, onde o processo de humificação se conclui [4].

Dois termos definem a qualidade de um composto quanto ao seu grau de decomposição: a estabilidade e a maturidade. A estabilidade está relacionada à atividade microbiana do processo e a maturidade ao potencial de crescimento vegetal promovido pelo composto. Compostos instáveis são caracterizados por conter altas quantidades de matéria orgânica facilmente degradável e sua aplicação no solo pode levar à perda de MO e quebra de estrutura e erosão dos solos. Além disso, compostos instáveis podem afetar a atividade microbiológica, causar deficiência de nitrogênio e oxigênio no solo e mesmo liberar substâncias fitotóxicas no ambiente. A maturidade do composto está relacionada com seu teor de SH, que são produzidas principalmente no último estágio da compostagem, a fase de maturação [6]. A caracterização química de SH ao longo do processo de compostagem é, portanto, uma etapa fundamental para compreender o processo de humificação [7] e suas implicações na qualidade do composto.

A compostagem natural da serragem é um processo demorado, principalmente devido a sua alta relação C/N inicial e a relativa estabilidade estrutural dos componentes da madeira, como a lignina e a celulose. Em geral, espécies não leguminosas, como *Pinus*, apresentam relação C/N maior que 100 (Tabela 1). A adição de uma fonte adequada de nitrogênio e de inóculos microbianos adequados à serragem são práticas utilizadas para aumentar sua velocidade de decomposição [8].

TABELA 1 - TEORES DE CARBONO TOTAL (C) E NITROGÊNIO KJEHDAL (N) DE SERRAGENS PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE RESERVA, PARANÁ.

Tipo de amostra por tempo de descarte	C (%)	N (mg/kg)	C/N	Umidade (65° C)
Pinus nova*	19,0	1,0	186,1	60,7
Pinus nova	22,1	1,2	178,2	52,7
Pinus nova	15,7	1,2	134,6	66,7
Pinus 3 meses	19,5	1,4	141,6	59,1
Pinus 3 meses	14,9	1,2	119,9	68,8
Pinus 4 meses	9,1	1,1	83,6	80,3
Pinus 6 meses	14,1	1,3	107,4	66,4
Pinus 6 meses	16,7	1,2	143,0	64,2
Imbuia**	16,4	4,1	40,1	66,8

NOTA: Análises feitas na Embrapa Florestas, dados não publicados.

* Serragem há menos de uma semana no depósito

** Imbuia = espécie leguminosa

2.2. HÚMUS E HUMIFICAÇÃO

O principal componente orgânico do composto é o húmus, que é também o principal componente da matéria orgânica [9]. O termo húmus remonta ao tempo dos antigos romanos [10] e tem sido usado na literatura, tanto para descrever os constituintes húmicos e não húmicos da MO, quanto como sinônimo de SH [11]. Neste trabalho o termo húmus será usado como esta última definição, ou seja, como sinônimo de SH.

O húmus resulta principalmente da degradação de tecidos vegetais mortos [12] e possui propriedades físico-químicas inteiramente diferentes do material original [13]. Classicamente, considera-se que a humificação é um processo bioquímico onde substâncias de baixa massa molar, resultantes da degradação microbiana, se condensam ou se agregam formando colóides amorfos de coloração marrom claro a escuro, com massa molar variável e grande estabilidade ao ataque microbiano. Muitos autores, porém, consideram o húmus uma mistura complexa de produtos de degradação vegetal [12]. Enquanto que, por exemplo, Stevenson define as SH como uma série de substâncias de massa molar relativamente alta, de coloração amarela a preta, formadas por reações de síntese secundárias [14], Wershaw por outro lado, considera que o húmus consiste de fragmentos de polímeros vegetais em diferentes estágios de oxidação [12].

Apesar da importância das SH na sustentabilidade da vida, suas natureza química e reatividade são ainda pouco compreendidas e a compreensão da organização estrutural de seus componentes é hoje, talvez, um dos desafios da pesquisa de SH, uma vez que se tratam de substâncias de grande heterogeneidade e complexidade [15]. As SH são misturas de substâncias que se desenvolveram aleatoriamente da deterioração de plantas e de tecidos animais, do metabolismo-catabolismo microbiano, ou de ambos [15,16]. A química de formação do húmus é altamente complexa e depende das diferentes propriedades do ecossistema no qual é gerado, tais como vegetação, clima e topografia [15].

As SH são parcialmente aromáticas, de natureza polieletrólita [16], cuja faixa de tamanho molecular é assunto de intensa discussão na literatura publicada nos últimos anos [16]. As SH não exibem mais as características químicas e físicas normalmente associadas a compostos orgânicos de estruturas bem definidas, de origem vegetal ou animal, que são resistentes à degradação química e biológica [9].

2.3. CLASSIFICAÇÃO E FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

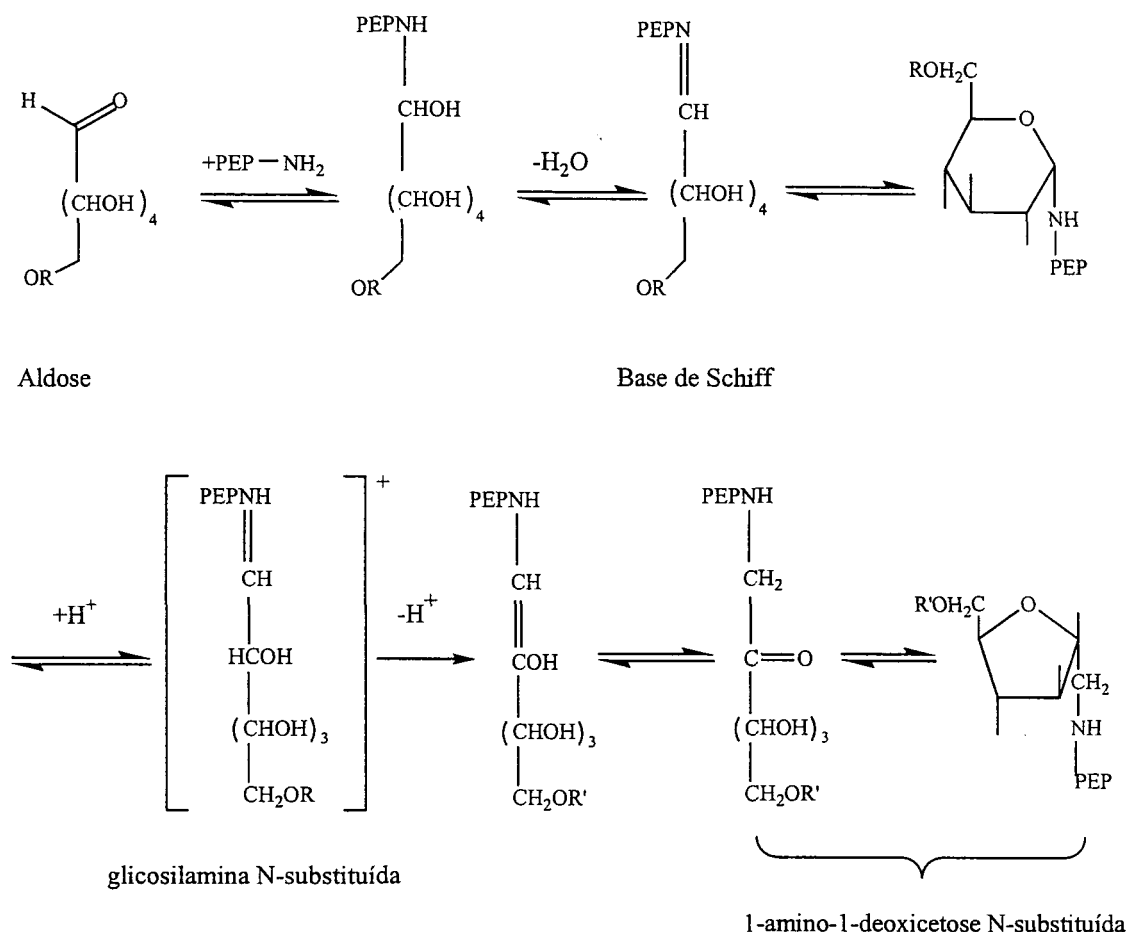
A classificação usual de SH é meramente operacional e baseia-se nas propriedades de solubilidade em soluções extratoras aquosas a diversos valores de pH. O termo ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e huminas (HU) referem-se às principais frações até hoje usadas para descrever os componentes húmicos [15]. A fração AH é aquela solúvel em valores de pH alcalino, a fração AF é aquela que, após solubilização em álcali, se mantém solúvel a qualquer valor de pH e a fração HU é insolúvel em toda faixa de pH.

Classicamente, considera-se que a síntese de SH, ou humificação, se daria por uma das seguintes formas: por degradação de biopolímeros vegetais para formar o cerne estrutural dos AH e por reações de condensação-polimerização nas quais polímeros vegetais são primeiro degradados a moléculas menores, os quais são então repolimerizados [9].

Desde o início do século XX, diversas teorias de formação do húmus foram propostas na literatura [9,14,17], algumas das quais são mais citadas ou discutidas, e serão descritas a seguir em ordem cronológica.

Maillard em 1917, sugeriu que os AH resultavam da interação entre açúcares reduzidos e aminoácidos ou aminas [9]. Apesar de sua ampla aplicação industrial, esta reação ainda não é totalmente compreendida, mas os estágios iniciais envolveriam a reação entre um peptídeo e uma aldose para produzir uma base de Schiff, a qual sofre o rearranjo de Amadori, via intermediário glicosamina N-substituído, para produzir uma estrutura 1-amino-1-deoxicetose N-substituída (Figura 1) [18]. Os polímeros marrons resultantes destas reações, que ele chamou de melanoidinas, eram ricos em nitrogênio e se assemelhavam às SH. Segundo Maillard, a formação do húmus era principalmente um processo químico, onde os microrganismos participavam somente na produção de açúcares e aminoácidos [9,18]. A principal objeção à esta teoria era que, nas temperaturas comumente encontradas nos solos, tais reações seriam muito lentas para explicar os processos naturais de humificação.

FIGURA 1 - ESQUEMA PROPOSTO PARA A REAÇÃO DE MAILLARD ATRAVÉS DO REARRANJO DE AMADORI [18].



A Teoria da lignina foi proposta primeiramente por Fischer e Schrader, em 1921 [9]. De acordo com esta teoria, a lignina seria utilizada de maneira incompleta pelos microrganismos e suas sobras seriam incorporadas ao húmus. Modificações químicas destes fragmentos de lignina ocorreriam no processo de humificação, tais como a perda de grupos metoxilas ($-\text{OCH}_3$), a geração de *o*-hidroxifenóis e a oxidação de cadeias laterais alifáticas, formando grupos carboxilas ($-\text{COOH}$). O material modificado estaria ainda sujeito a modificações posteriores para formar primeiro os ácidos húmicos e então os ácidos fúlvicos. Esta teoria porém não se podia explicar a menor relação carbono/nitrogênio (C/N) das SH quando comparada com a lignina. Waksman em 1938 [9] tentou aperfeiçoá-la, propondo

que proteínas de origem microbiana eram ligadas a fragmentos de lignina microbiologicamente modificadas para então formar as SH.

A Teoria do polifenol foi apresentada por Flaig em 1966 [9], que propôs que a lignina era degradada aerobiamente a monômeros fenólicos simples, os quais sofriam polimerização oxidativa, produzindo as SH. Ácidos e aldeídos fenólicos liberados da lignina pela ação microbiana eram convertidos enzimaticamente a quinonas, as quais polimerizavam tanto na presença como na ausência de amino compostos, formando as macromoléculas húmicas [9].

Em meados dos anos 80, alguns autores sugeriram processos de formação de SH conciliando os pontos positivos das diversas teorias e Stevenson foi um dos pioneiros neste tipo de abordagem. Porém, o próprio Stevenson reconhecia as limitações de sua proposta, onde várias etapas não eram explicadas e outras o eram de modo muito vago [19]. O último modelo proposto na literatura por Stevenson está ilustrado na Figura 2.

Também já havia claras evidências de que as estruturas aromáticas poderiam não ser tão condensadas como até então eram propostas e que anéis isolados eram um importante componente das substâncias húmicas. Além disso, a pesquisa intensiva sobre degradação oxidativa e redutiva conduzidas por Schnitzer e colaboradores evidenciaram que os componentes alifáticos eram mais importantes do que se supunha inicialmente [9].

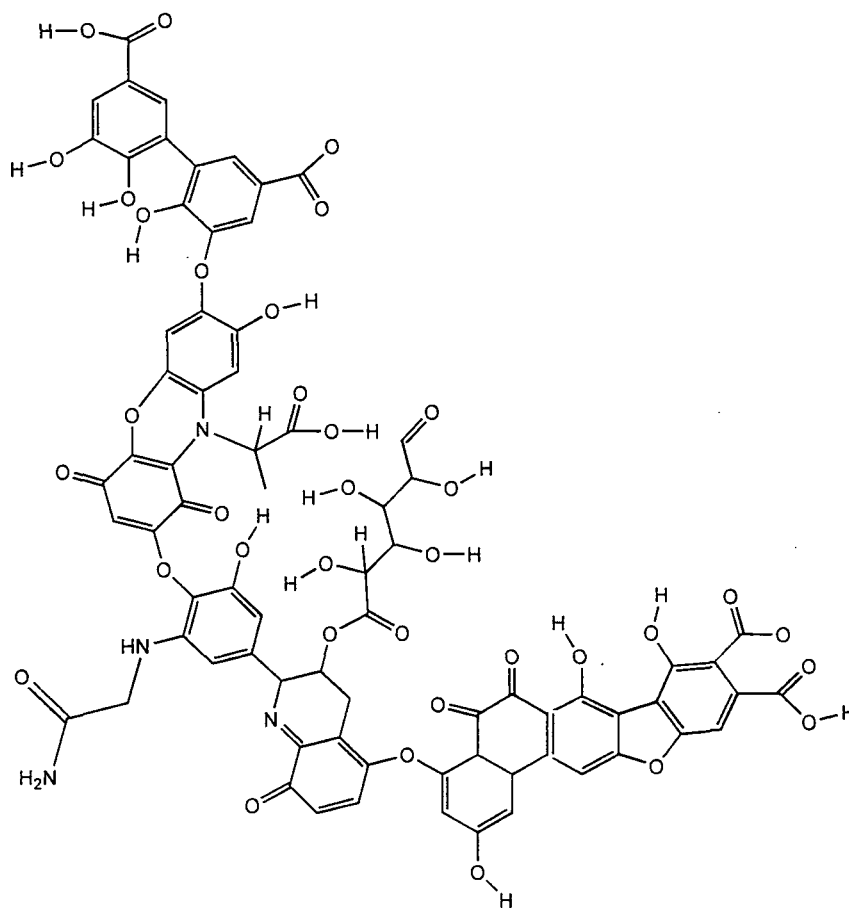
Recentemente, o modelo proposto por Stevenson foi mais uma vez reforçado pelos estudos sobre reações de acoplamento oxidativo em compostos fenólicos, conduzidos por Dec e colaboradores [20]. Dec estudou estas reações usando isótopos do carbono 14 (^{14}C) e enzimas (diversos tipos de fenoloxidasas) e concluiu que a liberação de íons cloreto (Cl^-), dióxido de carbono e metanol, durante processos de acoplamento oxidativo de fenóis substituídos, seriam controlados por um mecanismo comum, no qual vários substituintes são liberados se estes estão ligados a carbono aromático ou carbono alifático terminal que hospedem elétron desemparelhado. Dec demonstrou que a evolução de $^{14}\text{CO}_2$ estava principalmente associada com a liberação de carboxila dos compostos estudados e que a clivagem de anel ou mineralização de carbono alifático em alguns substratos (tais como ácidos *p*-cumárico e ferúlico) não contribuía para a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ [20]. Este estudo mostrou ainda que Cl^- e CO_2 são liberados com mais facilidade do que metoxilas ($-\text{OCH}_3$) e

que a suscetibilidade à liberação parece ser dependente da natureza química do substituinte, representada pela constante do substituinte σ da equação de Hammett (Equação 1):

$$\log k/k_0 = \rho\sigma \quad (1)$$

onde k e k_0 são as constantes de equilíbrio da reação para anéis substituídos e não substituídos, respectivamente, e ρ é a constante da reação ou a inclinação da reta resultante desta equação, que determina se a reação é estimulada por substituinte doador ou retirador de elétron. Desta forma, grupos substituintes retiradores de elétron, tais como Cl^- e $-\text{COOH}$, (com valores de σ positivos, 0,23 e 0,41 respectivamente) são liberados mais rapidamente do que grupos doadores de elétron tais como $-\text{OCH}_3$ e $-\text{CH}_3$ (com valores negativos de σ , -0,27 e -0,17 respectivamente) [20].

FIGURA 2 - MODELO DE ÁCIDO HÚMICO ADAPTADO DE STEVENSON [14]:



No final da década de 80 e início dos anos 90, vários trabalhos contribuíram para que, lentamente, as velhas teorias de gênese do húmus fossem substituídas por novas abordagens e paradigmas. Tais teorias amadureceram a partir dos trabalhos de Wershaw e Pinckney [citados por 12], que já em 1973 vinham estudando os mecanismos de agregação molecular de SH em diferentes valores de pH. Eles concluíram que as frações húmicas eram quimicamente diferentes e que as diferenças de comportamento de formação de agregados refletiam a interação de diferentes mecanismos de ligação. Wershaw e Pinckney propuseram três diferentes mecanismos: ligações de hidrogênio, ligações π (empilhamento de grupos π -planar-doador e π^* -planar-receptor para formar um complexo) e complexação por transferência de carga [12]. Nesta mesma época, Schnitzer e Khan (citados por 12) sugeriram que os ácidos fúlvicos mantinham-se agregados por ligações de hidrogênio entre grupos fenólicos e benzenocarboxílas. Com este trabalho, eles também estabeleceram que estes agregados formavam “buracos” de diversos tamanhos que podiam aprisionar ou fixar pequenas moléculas orgânicas. De fato, a química ambiental muito contribuiu no avanço do conhecimento das estruturas das SH.

Entre os anos 70 e 80, vários trabalhos estudaram as associações de íons metálicos com estruturas de SH e entre eles os trabalhos de Jouary e Chassin (1987, citado por 12) mostraram que ferro e H^+ em excesso levavam à precipitação de agregados húmicos hidrofóbicos e que cálcio em excesso levava à precipitação de agregados hidrofílicos. Wershaw interpretou estes resultados propondo que, no primeiro caso, o ferro formava ligações entre os grupos polares dos AH, de tal forma que as partes hidrófobas da molécula estariam na superfície interior dos agregados e que os grupos polares e o ferro ligados estariam no exterior dos agregados. No caso do cálcio, este neutralizava as cargas superficiais, mas não interferia nas pontes entre elas. Wershaw propôs também que grupos carboxilas neutralizados pelo excesso de ligações de hidrogênio reduziam a hidrofilicidade. Este autor afirma que as SH consistem principalmente de moléculas anfífilas originárias da degradação enzimática de polímeros vegetais, as quais formariam agregados do tipo membrana sobre superfícies minerais e agregados do tipo micelas quando em solução [12].

O modelo estrutural concebido por Wershaw representou um avanço importante nas propostas estruturais, pois aqui se introduz o conceito de agregados formados por

constituintes de diferentes tamanhos, o que finalmente poderia explicar as grandes discrepâncias registradas na literatura sobre o tamanho molecular das SH [15]. Apesar disto, o modelo micelar proposto por Wershaw ainda não elucidava o problema do tamanho molecular das SH. A agregação espontânea das moléculas húmicas em micelas foi ainda sustentada por outros autores, como Engebretson e von Wandruska [21,22], mas a interpretação dos resultados ainda se prendia à teoria da natureza polimérica das SH.

A partir do início dos anos 90 também foram publicados os primeiros trabalhos de Piccolo e colaboradores [15], mostrando o comportamento de humatos de sódio de diferentes origens em sistemas de Cromatografia de Exclusão ou “High Pressure Size Exclusion Chromatography” (HPSEC), quando associados a diferentes tipos de ácidos orgânicos e minerais. Estes trabalhos formaram a base da teoria supramolecular de agregação húmica, que sugere que as SH seriam formadas por moléculas pequenas e heterogêneas de várias origens, auto-organizadas em conformações supramoleculares. As idéias de Piccolo, até então sustentadas por resultados obtidos por HPSEC, foram reforçadas pelos resultados de Simpson [23] que, através de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear Multidimensional, demonstrou que SH extraídas de solos eram formadas por uma mistura de substâncias agregadas de baixa massa molar (em torno de 2000 Da). Simpson propôs um modelo conceitual para ilustrar como as principais estruturas identificadas nas SH em seu trabalho poderiam formar um agregado na presença de cátions metálicos de ocorrência natural nos ecossistemas terrestres (Figura 3).

Outro impulso para a mudança de paradigmas foi a constatação que as frações húmicas baseadas na solubilidade (AF, AH e HU) não se correlacionavam tão bem com o “turnover”¹ microbiano quanto às frações isoladas por características físicas como tamanho ou densidade [24]. Assim, a forma física parece ser pelo menos tão importante quanto o estado químico na determinação da reatividade da MO. Aspectos como recalcitrância das SH e sua correlação com a ausência de água nesta fração da MO, estão agora associadas à proteção conferida à estrutura por arranjos hidrófobos e hidrófilos específicos, capazes de

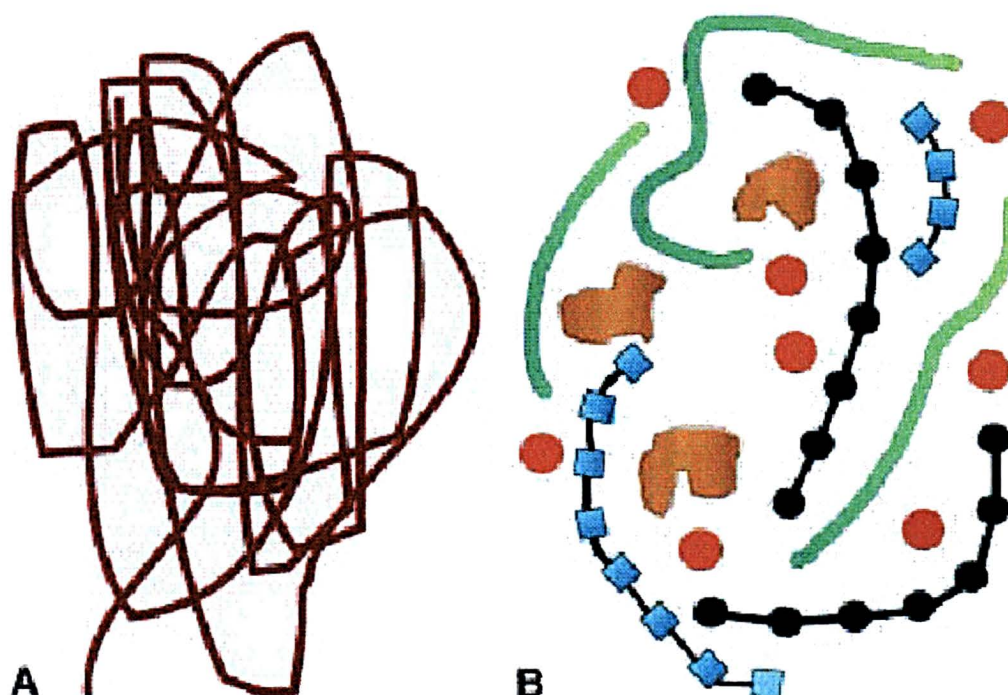
1 Constante catalítica característica da enzima que representa o número máximo de moléculas de substrato convertidas em produto, por sítio ativo e por unidade de tempo, ou seja, o número de vezes que a enzima atua por unidade de tempo

formar ambientes moleculares “encapsulados” [24], o que explicaria a resistência à degradação destes recalcitrantes por décadas, séculos e até milênios.

Todas estas informações provocaram novas abordagens e discussões que culminaram com a publicação de várias revisões críticas feitas pelos principais expoentes em química de SH da atualidade, onde se destacam os artigos de Burdon, Clapp e Hayes, Piccolo e MacCarthy [11,15,25].

Burdon, por exemplo, afirma que as estruturas tradicionalmente sugeridas na literatura para SH, não existem nos solos e que a MO consiste de uma mistura de constituintes vegetais e microbianos em vários estágios de degradação. Este autor argumenta que não há sentido na síntese de substâncias químicas sem uma função definida e que qualquer microrganismo que trabalhasse nessa direção estaria fadado à extinção [25].

FIGURA 3 - MODELOS CONCEITUAIS DE AGREGADOS HÚMICOS [23]:
A - CONCEITO TRADICIONAL DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS COMO MACROMOLÉCULAS ALEATORIAMENTE ENOVELADAS (SWIFT 1989); B - CONCEITO DE SIMPSON: SH DE MASSA MOLAR BAIXA ASSOCIAM-SE A METAIS PARA FORMAR AGREGADOS (AS UNIDADES VERDES REPRESENTAM CADEIAS ALIFÁTICAS, AS UNIDADES MARRONS FRAGMENTOS AROMÁTICOS, ● REPRESENTA CÁTIOS METÁLICOS E ■ POLIPEPTÍDIOS).



O autor descarta a possibilidade de síntese microbiana de SH, e também descarta a síntese abiótica, especialmente pela reação de Maillard, argumentando que: a) as concentrações, tanto de açúcares como de proteínas, peptídeos ou aminas são naturalmente muito baixa nos solos; b) a reação de Maillard é favorecida por pH alcalino e solos alcalinos não se diferenciam na concentração de SH dos solos ácidos; c) aminas e amônio, e não amidas, são as principais fontes de nitrogênio nas SH. Burdon sustenta ainda que, todos os dados espectroscópicos encontrados para SH podem ser também obtidos para uma mistura de metabólitos vegetais ou animais [25].

2.4. A TEORIA SUPRAMOLECULAR DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Entre as novas teorias que surgiram na literatura nos últimos anos, está a teoria supramolecular de SH. Antes de introduzir os conceitos da teoria propriamente dita, é necessário descrever alguns conceitos básicos inerente à química supramolecular.

A “química supramolecular” é definida como a “química dos arranjos moleculares e das ligações intermoleculares” e envolve entidades de grande complexidade que resultam da associação de duas ou mais espécies químicas unidas por forças intermoleculares. Forças intermoleculares que levam a formação de estruturas supramoleculares podem ser ligações secundárias, ligações de hidrogênio, interações doador-aceptor (tipo ácido-base de Lewis) ou interações iônicas [26]. São classificadas como supramoléculas aquelas espécies nas quais as propriedades eletrônicas das subunidades são perturbadas apenas devido à formação das ligações entre elas. As interações intermoleculares podem ser muito pronunciadas, como no caso das espécies formadas pelo empilhamento de moléculas de porfirinas e ftalocianinas, que apresentam condutividade elétrica similar à dos polímeros dopados com metais, sugerindo a presença de um sistema π deslocalizado por toda a extensão da pilha. A química supramolecular usa uma abordagem centrada na associação de moléculas, visando a obtenção de uma determinada propriedade ou funcionalidade [27]. A formação de estruturas supramoleculares é um processo espontâneo e não ocorre em etapas e envolve o processo conhecido como "reconhecimento molecular". Automontagem ou “self-assembly” é o principal processo espontâneo que confere ordem aos materiais moleculares [28]. O processo de automontagem molecular envolve interações não

covalentes e a construção de supramoléculas é controlada termodinamicamente, levando a estruturas finitas (tais como dímeros unidos por ligações de hidrogênio) ou a supermoléculas extendidas (cadeias lineares, planos bidimensionais ou redes tridimensionais) [28].

De acordo com Jean-Marie Lehn (prêmio Nobel de Química de 1987) [26] “a química supramolecular é uma generalização da química de coordenação”. Em compostos supramoleculares podemos distinguir três níveis de organização estrutural: a estrutura primária (no nível molecular); a estrutura secundária, que consiste da associação de moléculas (ou seja, entidades supramoleculares que resultam das interações intermoleculares); e a estrutura terciária, isto é, o empacotamento cristalino tridimensional das entidades supramoleculares [26]. A química supramolecular vem se desenvolvendo a partir dos avanços de conhecimento sobre a química da funcionalidade de espécies bioquímicas e os novos materiais produzidos por meio deste conhecimento são a base do desenvolvimento da engenharia molecular e da nanotecnologia.

Segundo Piccolo e colaboradores, as SH seriam moléculas pequenas e heterogêneas, de várias origens e auto-organizadas em conformações supramoleculares. As superestruturas húmicas não estariam associadas por ligações covalentes, mas seriam estabilizadas somente por forças fracas tais como interações hidrofóbicas (van der Waals, $\pi - \pi$, e ligações CH- π) e ligações de hidrogênio, estas últimas sendo progressivamente mais importantes em valores crescentes de pH. Nas organizações húmicas supramoleculares, as forças intermoleculares determinariam a estrutura conformacional das SH e a complexidade das interações múltiplas não covalentes controlariam sua reatividades ambientais [15].

A definição dada por Lehn pode então ser bem aplicada às SH: “um conjunto supramolecular é formado por entidades que resultam da associação espontânea de um grande número indefinido de componentes em uma fase específica, tendo organização microscópica mais ou menos bem-definida e características macroscópicas dependendo de sua natureza (tais como filmes, membranas, vesículas, micelas, fases mesomórficas e estruturas em estado sólido)” [29].

Considerando estes novos conceitos, as definições das diferentes frações das SH poderiam ou deveriam ser revistas. Os AF, por exemplo, seriam associações de pequenas moléculas hidrófilas, nas quais existe um número suficiente de grupos ácidos para manter os “clusters”, por elas formados, dispersos em solução a qualquer valor de pH. Os AH são constituídos de substâncias principalmente hidrófobas (tais como cadeias polimetilênicas, ácidos graxos e esteróides), que são estabilizados em pH neutro por forças dispersivas hidrófobas (van der Waals, $\pi - \pi$, e ligações CH- π). Suas conformações crescem gradualmente em tamanho quando ligações de hidrogênio intermoleculares são formadas em intensidade crescente em baixos valores de pH, até sua precipitação [15].

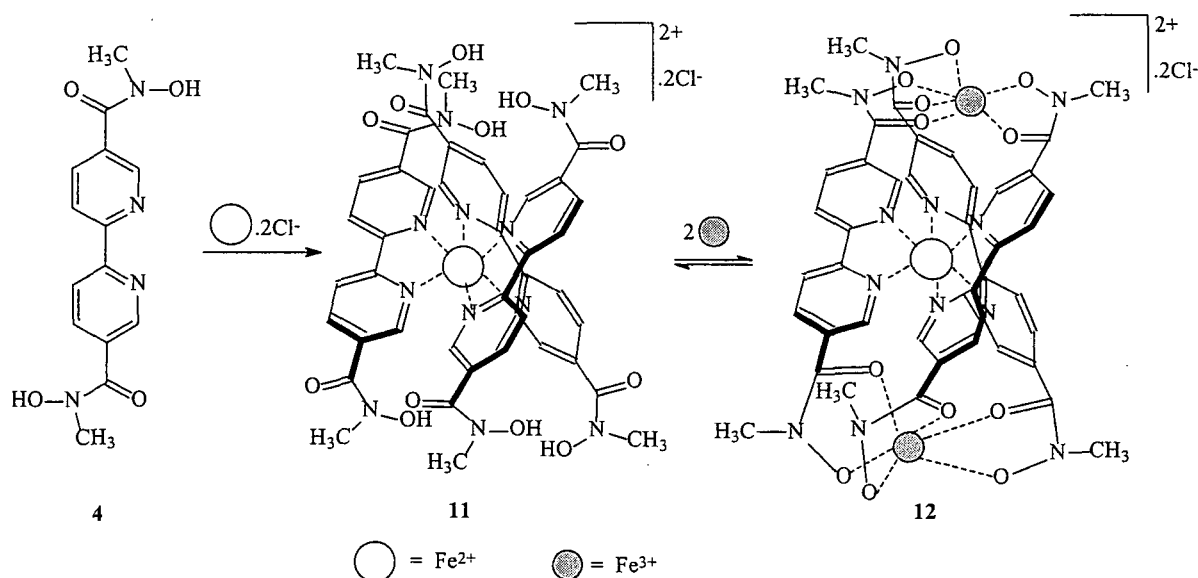
Recentemente, modelos de interações de moléculas orgânicas, com átomos de oxigênio e nitrogênio como doadores foram usados para “self-assembling” com íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} . Este trabalho demonstrou, através da automontagem por complexação sequencial para a síntese de uma estrutura trimetálica, a habilidade de ácidos moles tais como o Fe^{2+} , de associaram-se aos centros nitrogenados da bipyridina em uma estrutura trinuclear, gerando um geometria secundária nos centros oxigenados dos grupos hidroxâmicos, capazes de complexarem-se, por sua vez, com um ácido duro como o Fe^{3+} e gerando um estrutura supramolecular trimetálica (Figura 4) [30]. Poder-se-ia imaginar que reações semelhantes a estas poderiam estar acontecendo no complexo organomineral dos solos, especialmente solos tropicais, ricos em óxidos de ferro e alumínio.

Diferentemente das estruturas desenvolvidas em laboratório ou em sistemas biológicos, as estruturas húmicas supramoleculares seriam desprovidas de uma funcionalidade programada, embora não isentas de funcionalidade, pois as características químicas que usualmente são associadas aos benefícios agronômicos das SH nos solos, exaustivamente conhecidos, dependem grandemente da conformação destas estruturas. A associação das SH com a fração inorgânica mineral do solo, especialmente com as argilas, poderia ter um papel fundamental no desenvolvimento desta funcionalidade e as argilas poderiam funcionar como verdadeiras matrizes de organização molecular.

Finalmente, o que se pode ainda argumentar quanto aos aspectos da gênese de SH, é que seria de se esperar que não um, mas diversos processos e mecanismos estariam aqui envolvidos, podendo prevalecer um ou outro de acordo com o ambiente estudado, o tipo de

solo, sua estrutura e profundidade, tipo de material orgânico e inorgânico envolvido, tipo de ambiente aquático (água doce ou marinha) e alterações antropogênicas, por exemplo.

FIGURA 4 - ESQUEMA DA COMPLEXAÇÃO DE Fe^{2+} - TRIS (BIPYRIDINA) COM FeCl_2 PRIMEIRAMENTE, SEGUIDA DA TITULAÇÃO COM SOLUÇÃO DE FeCl_3 , PRODUZINDO A ESTRUTURA TRINUCLEAR [30].



2.5. A ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

O preparo de amostras para análise de SH requer a separação de componentes complexos em matrizes ainda mais complexas, tais como as argilas dos solos. As SH podem ainda estar associadas a pequenas moléculas orgânicas de origem antropomórfica e a espécies inorgânicas, tais como metais e outros íons. Muitos cientistas insistem em distinguir os componentes húmicos da MO dos não húmicos. O problema com esta abordagem é que, operacionalmente, não há maneira de separar estas duas classes de componentes e que os componentes “não húmicos” estão presentes em quantidades importantes e têm um papel essencial nas propriedades das SH [12,31].

Usualmente extratores fortemente alcalinos, tais como soluções de NaOH, são usados para isolar as frações húmicas de solos, sedimentos, turfa e composto agrícola. Também são usados pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) ou mistura pirofosfato e NaOH [32].

Uma vez obtidas as frações húmicas, os métodos mais freqüentemente usados na caracterização de SH podem ser agrupados em destrutivos e não destrutivos. As técnicas espectroscópicas estão entre os métodos não destrutivos mais importantes [33].

2.5.1. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

2.5.1.1. *Ressonância magnética nuclear de carbono treze*

A Ressonância magnética nuclear de carbono treze no estado sólido é uma das técnicas atuais mais poderosas para a determinação de grupos funcionais orgânicos tais como C alifático, C aromático, C ligado a heteroátomos, carboxilas e carbonilas. Porém, para a obtenção de um bom espectro, é necessário o correto ajuste dos parâmetros experimentais, pois quando comparado com líquidos, a mobilidade das moléculas no estado sólido é muito menor e as interações dependentes de orientação não se anulam entre si, provocando o alargamento do sinal [34]. Em experimentos de RMN no estado sólido, estas interações são:

- acoplamento dipolar: este efeito é da ordem de 0 a 105 Hz e surge da interação entre dipolos magnéticos nucleares do núcleo observado e núcleos vizinhos presentes na molécula. Quanto maior a razão magnetogírica, γ , do núcleo, maior o alargamento produzido no sinal. Parte destes efeitos é proporcional ao termo angular $(3\cos^2\theta - 1)$ existente entre o vetor magnetização (eixo y) e o campo magnético (eixo z);
- anisotropia do deslocamento químico: é da ordem de 0 a 105 Hz e provoca alargamento do sinal proporcionalmente ao campo magnético B_0 . É produzido devido à absorção de ressonâncias distintas produzidas pela distribuição de orientações estáticas dos spins nucleares mediante a aplicação de um campo magnético B_0 . Este efeito é também proporcional ao termo angular $(3\cos^2\theta - 1)$;

- interação quadrupolar: da ordem de 0 a 109 Hz; é produzida devido à interação dos spins com a nuvem eletrônica local. Este efeito é tanto maior quanto maior for a complexidade da nuvem eletrônica ao redor no núcleo. Para núcleos de número quântico de spin $\frac{1}{2}$, este efeito é igual a zero e núcleos de número quântico de spin maior que $\frac{1}{2}$ possuem momentos quadrupolares diferente de zero e sofrem alargamento de sinal [34,35].

O lento movimento molecular nos sólidos também resulta em poucas vias de relaxação, o que leva a tempos de relaxação spin-rede (T_1) longos. Para minimizar os problemas aqui descritos, as técnicas de RMN no estado sólido mais frequentemente utilizadas são a transferência de polarização ou “cross polarization” (CP), a rotação no ângulo mágico ou “magic-angle spinning” (MAS) e a alta potência de desacoplamento ou “high power decoupling” (HPDEC).

A técnica CP é um método de transferência de magnetização de um núcleo abundante para outro não abundante, no qual se obtém um significativo aumento na razão sinal/ruído. No caso dos núcleos ^1H - ^{13}C , este aumento é da ordem de 4 vezes. Além disto, o intervalo entre pulsos é determinado pelo núcleo de spin abundante que, em geral, possui T_1 mais curto que o do núcleo raro.

A técnica MAS consiste em girar fisicamente a amostra à elevadas velocidades de rotação (entre 2 e 20 kHz) no ângulo de $54,7^\circ$ em relação ao eixo z. Para isto, é usado uma sonda especial para amostras sólidas. A rotação no ângulo de $54,7^\circ$ iguala o termo angular $(3 \cos^2 \theta - 1)$ a zero e o espectro resultante apresenta sinais com maior resolução. A rotação da amostra provoca o aparecimento de bandas laterais ou “side bands” e a velocidade de rotação deve ser ajustada para que estas não se sobreponham a outros sinais de interesse no espectro.

A técnica de HPDEC consiste na aplicação de um forte campo de radiofrequência com alta potência no canal do próton. Esta técnica remove o alargamento do sinal devido a acoplamento dipolar heteronuclear, em geral de núcleos de ^1H , que é muito maior no estado sólido por causa da baixa mobilidade dos núcleos [34,35].

Várias outras técnicas podem ser usadas no estudo de SH no estado sólido. Entre elas está o defasamento dipolar (DD) ou supressão de carbonos não quaternários, que

possibilita a observação de C não protonados. A sequência de pulsos consiste na inserção de um intervalo sem desacoplamento (os tempo de defasagem são tipicamente entre 40 – 100 μ s), entre o contato e a aquisição do sinal dos núcleos de ^{13}C . Durante este intervalo, a magnetização dos C ligados a prótons (CH , CH_2 e CH_3), decai rapidamente para zero, ao contrário dos átomos de C sem H, que ainda originam sinais intensos durante o período de aquisição. O resultado é a supressão preferencial dos sinais dos C protonados.

A RMN de ^{13}C no estado sólido é muito usada no estudo de ligninas e SH por fornecer informação direta sobre as características estruturais e conformacionais de seus esqueletos carbônicos, sendo especialmente ideal para estudar estes materiais sem fracionamento químico [36,37]. Esta técnica deve, no entanto, ser conduzida com cautela, uma vez que apresenta limitações em estudos quantitativos. A taxa de transferência de polarização, por exemplo, depende da proximidade dos núcleos estudados com os núcleos de prótons e da mobilidade molecular. Assim, em grupos metilênicos a transferência de polarização é eficiente enquanto que ^{13}C de grafites não o são. Como consequência, os vários átomos de carbono da MO têm respostas diferentes na RMN no estado sólido.

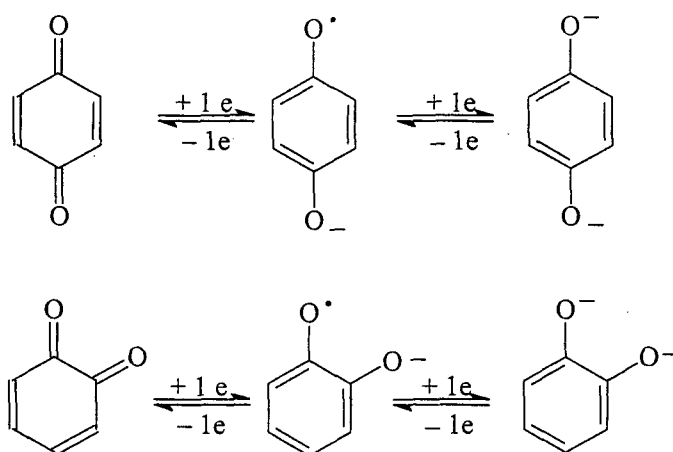
2.5.1.2. *Espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de UV-Vis*

A espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) fornece informações sobre a natureza dos principais grupos funcionais presentes nas SH de resíduos orgânicos [38]. A espectroscopia de UV-Vis ou eletrônica, permite a identificação de transições de elétrons entre níveis de energia adjacentes. A razão E_4/E_6 (razão entre as absorbâncias em 465 e 665 nm), determinada pela absorção no visível, tem sido usada para avaliar o grau de humificação da MO no ambiente. Segundo alguns autores, a baixa razão E_4/E_6 está diretamente relacionada com o aumento da massa molar e condensação de grupos aromáticos e está inversamente relacionada com a quantidade de grupos alifáticos. Estudos mostram que este índice independe da concentração de material húmico, mas varia para materiais obtidos de diferentes tipos de solos e sedimentos [39].

2.5.1.3. *Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica*

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é usada na caracterização química de SH para detalhar as interações e formação de complexos de grupos funcionais orgânicos com metais paramagnéticos, tais como Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e para estudar a concentração de radicais livres orgânicos geralmente atribuídos à presença de sistema quinona – semiquinona, possivelmente em sistema conjugado a anéis aromáticos, (Figura 5) [40]. Os radicais livres e alguns metais de transição caracterizam-se pela presença de um ou mais elétrons desemparelhados paramagnéticos e podem produzir sinal de ressonância de spin eletrônico, tanto no estado livre quanto em associação com espécies orgânicas ou inorgânicas, onde o desemparelhamento é mantido. Tanto AH quanto AF são sabidamente ricos em radicais livres orgânicos, os quais são nativos em sua estrutura molecular e representam uma de suas mais peculiares propriedades reativas [40].

FIGURA 5 - SISTEMA DE CONVERSÃO QUINONA-SEMIQUINONAS POR OXIDAÇÃO REDUÇÃO DE ORTO- E PARA-QUINONAS [40].



Espectros de RPE de SH apresentam tipicamente sinal de radicais livres orgânicos em torno de $g = 2,00$ (próximo ao campo de ressonância do elétron livre) e linhas largas em $g = 9,0$ e $4,3$, atribuídas ao íon Fe^{3+} em sítio tetraédrico ou octaédrico em spin alto e campo cristalino de simetria rômbrica, sugerindo que os íons Fe^{3+} estejam fortemente ligados e

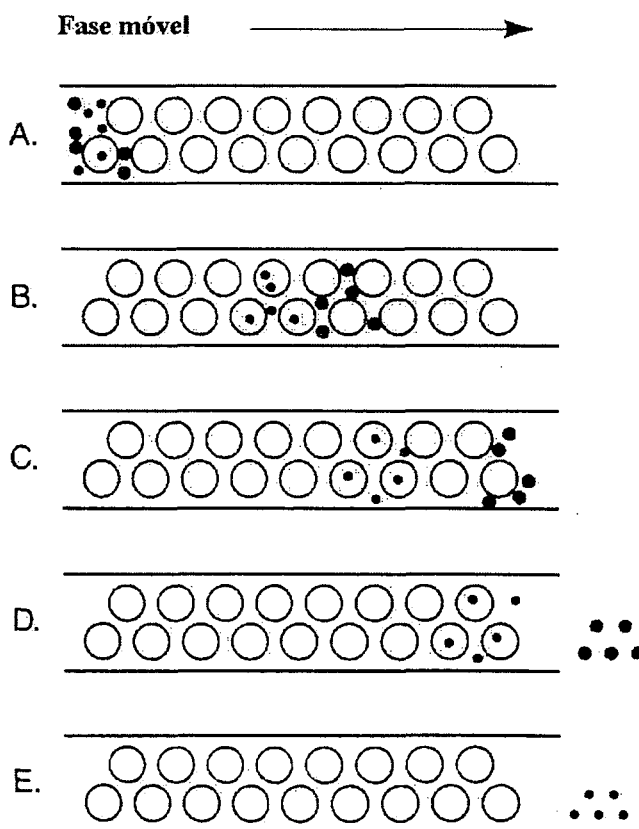
protegidos dentro das estruturas das SH. Um outro conjunto comum nos espectros da matéria orgânica é o do sexteto de linhas devido aos íons $^{55}\text{Mn}^{2+}$. Cada linha é separada da próxima por cerca de 100 G ($A = 100$ G) e o fator $g = 2$. Além dos sinais típicos em RPE, a quantificação de spins por grama é outro parâmetro classicamente usado na descrição química das SH. Esta é uma medida difícil e pouco exata, pois a medida absoluta da concentração de spins requer o conhecimento de um grande número de fatores, os quais podem encerrar erros e variar grandemente com as condições ambientais. A concentração de spins é portanto geralmente estimada usando-se um padrão contendo um número de centros paramagnéticos conhecido. Uma vez que a área sob a curva de absorção (usa-se em geral a primeira derivada da curva original) é diretamente proporcional ao número de centros paramagnéticos contribuintes para a ressonância, a concentração de uma amostra pode ser calculada comparando-se sua área com a área do padrão [40].

2.5.2. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

O fracionamento baseado em distribuição de faixa de tamanho molecular é outra técnica recomendada na análise de SH, pois, além desta ser uma importante característica dos ácidos húmicos, o conhecimento da distribuição do tamanho molecular de suas frações, pode auxiliar na compreensão do papel que estas frações têm durante os processos de decomposição e humificação [41]. Neste sentido, a cromatografia de exclusão por tamanho ou Size Exclusion Chromatography (SEC) é amplamente utilizada em estudos da matéria orgânica de solos para avaliar as dimensões moleculares dos extratos húmicos provenientes dos diferentes compartimentos ambientais, tais como solos e águas [42,43,44], para correlacionar o tamanho das moléculas das frações húmicas com características de gênese do solo, para estudar a influência do tamanho molecular das SH na atividade biológica dos solos [45] e para investigar a natureza das interações entre SH e xenobióticos [46,47]. Além disso, a SEC permite caracterizar a matéria orgânica dissolvida [48,49,50], estudar o comportamento ambiental de poluentes orgânicos a ela associados [51], compreender os efeitos de compostos orgânicos nas estruturas conformacionais de SH [52,53,54] e compreender os processos de transporte de pesticidas quando associados com SH em solos.

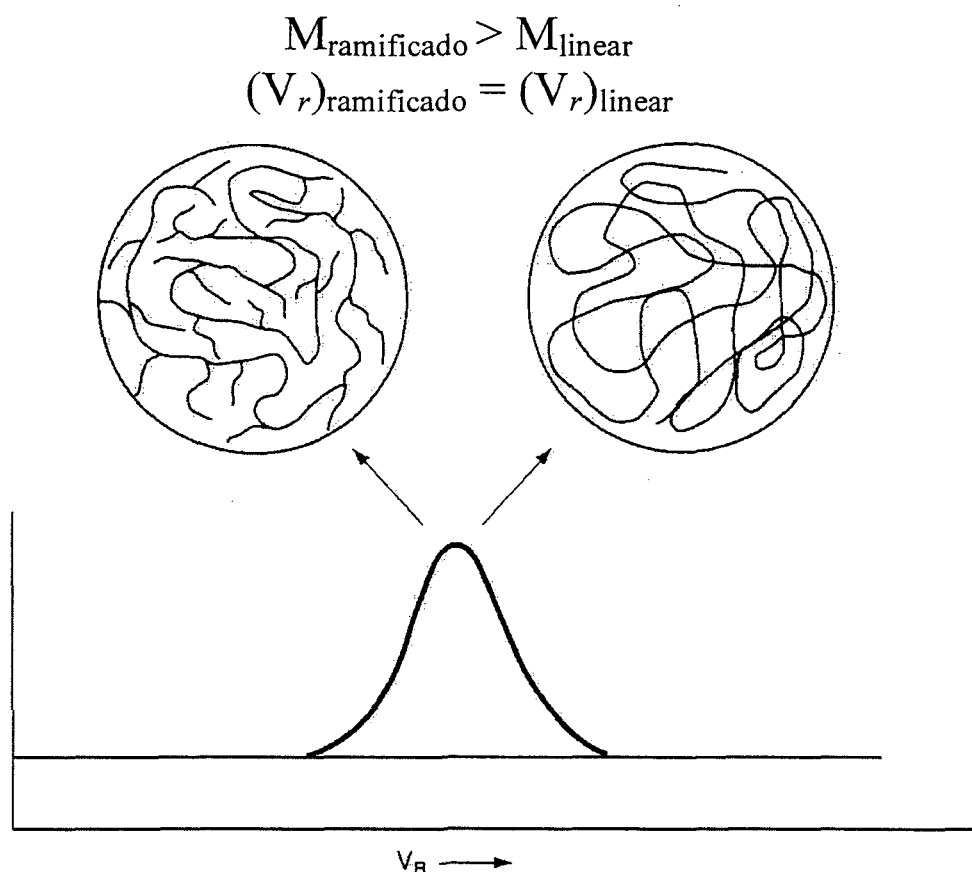
A SEC é muito usada na caracterização de SH, principalmente para a determinação da massa molar média e para o fracionamento preparativo. A escolha desta técnica baseia-se no princípio de que o efeito da exclusão por tamanho é o único responsável pelo fracionamento. Assim, em uma mistura de moléculas de diferentes tamanhos, as moléculas menores penetrariam mais profundamente nos poros da fase estacionária, tornando deste modo, seu percurso mais longo do que para moléculas maiores, promovendo assim uma separação pela diferença no volume de retenção na coluna de cada componente da mistura. Moléculas maiores por outro lado, seriam incapazes de penetrar nos poros da fase estacionária, o que faria com que seu percurso fosse relativamente mais curto e seu volume de retenção menor (Figura 6) [55].

FIGURA 6 - -ESQUEMA DE UMA SEPARAÇÃO DE POLÍMEROS DE BAIXA (•) E ALTA (●) MASSA MOLAR, POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO:
A) INÍCIO DA SEPARAÇÃO; B) MOLÉCULAS PEQUENAS DIFUNDEM DENTRO DOS POROS, ENQUANTO MOLÉCULAS GRANDES ELUEM ATRAVÉS DA REGIÃO INTERSTICIAL DA FASE ESTACIONÁRIA; C) SEPARAÇÃO POR TAMANHO D) MOLÉCULAS GRANDES, COM MENOR VOLUME DE ELUIÇÃO, ELUEM PRIMEIRO; E) MOLÉCULAS PEQUENAS ELUEM POR ÚLTIMO [55].



Uma vez que a separação na SEC é regulada pelo tamanho das moléculas em solução, solutos de volumes hidrodinâmicos semelhantes, mas de diferentes massas molares eluirão ao mesmo tempo ou volume de retenção. Este conceito está representado na Figura 7 a qual mostra uma cadeia muito ramificada eluindo no mesmo volume de retenção que uma cadeia linear [55].

FIGURA 7 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE AMOSTRAS LINEARES E RAMIFICADAS COM VOLUMES HIDRODINÂMICOS (V) SEMELHANTES, MAS DIFERENTES MASSAS MOLARES (M) [55].



A técnica de SEC pode ser classificada em dois grupos: cromatografia de exclusão a baixa pressão ou low pressure size exclusion chromatography (LPSEC) e cromatografia de exclusão a alta pressão ou high pressure size exclusion chromatography (HPSEC). As

principais vantagens da técnica HPSEC são o menor volume consumido na separação, a alta resolução, a alta reprodutibilidade e a estabilidade da fase estacionária em valores extremos de pH, à concentração salina ou ainda aos solventes orgânicos. Além disso, a preparação manual da coluna LPSEC é trabalhosa, requer grande prática e consome muito volume de fase estacionária. Devido a grande rigidez das colunas cromatográficas de aço usadas na HPSEC, esta técnica é mais rápida e reprodutível e opera em uma larga faixa de pH [54].

A principal diferença entre a LPSEC e a HPSEC está no fato de que esta última técnica usa colunas de tubos de aço inoxidável, as quais podem resistir à alta e constante pressão produzida pelas bombas usadas nestes sistemas. A fase estacionária é composta de finas partículas ($\leq 5\mu$) de géis de matrizes rígidas de sílica-gel esférica, quimicamente ligadas com compostos hidrofílicos, ou material hidrofílico obtido da co-polimerização de etileno glicol e metacrilatos poliméricos. Por fim, pode-se usar diferentes tipos de detectores, em série ou não, como por exemplo UV-Vis, índice de refração e fluorescência.

Numerosas soluções salinas ou tamponantes podem ser usadas como eluentes das SH através das colunas HPSEC em diferentes fluxos [44]. Entretanto, o pH, a força iônica e a concentração da amostra devem ser rigidamente controlados, de forma a manter a alta reprodutibilidade da distribuição de tamanho molecular dos componentes húmicos, que a técnica HPSEC pode assegurar. A temperatura é também outro parâmetro que precisa ser controlado, o que pode ser facilmente obtido através da imersão das longas colunas em banhos termostatzados.

2.5.2.1. *Cálculo das massas molares de substâncias húmicas*

Uma das dificuldades do uso da técnica HPSEC na análise de SH está na escolha de padrões adequados para calibração da coluna, seja para determinar os volumes total (V_t) e de vazios (ou volume morto, V_0), seja para obter os volumes de retenção dos respectivos tamanhos moleculares dos padrões. V_0 e V_t podem ser medidos usando-se padrões moleculares de massas maiores (Blue Dextran, por exemplo) e menores (fenol e água, por exemplo) que os limites de tamanho molecular indicados pelo fabricante da coluna.

As curvas de calibração podem ser obtidas construindo-se a curva do logaritmo da massa molar ao longo do volume de retenção do padrão (minutos). A calibração da coluna para obter as massas molares de SH é complicada devido à falta de padrões apropriados para sua estrutura química. Qualquer padrão de calibração utilizado pode ter raios hidrodinâmicos e estar sujeito à interações com a fase estacionária diferentes daquelas encontradas para SH [56]. Os padrões moleculares geralmente usados na análise de SH podem ser proteínas globulares, polissacarídeos, polietilenoglicóis (PEG) ou poliestirenosulfonatos (PSS) de massas molares conhecidas [54,57]. Os PSS são mais semelhantes às estruturas de SH do que os PEG [58] e são usados com sucesso para avaliar a distribuição de massa molar de SH dissolvidas, embora não representem bem o conteúdo de carbono aromático destas substâncias [50] e sua fraca acidez [43].

Os parâmetros usados na SEC foram originalmente definidos para polímeros sintéticos, que são um conjunto de macromoléculas formadas a partir de um mesmo monômero, que possuem diferentes massas molares. Como os polímeros não são substâncias puras, no sentido usual da Química Orgânica, e sim uma mistura de moléculas de diferentes massas moleculares, é preciso conhecer a curva de distribuição dessas massas [59]. Portanto, a massa molar de um polímero sintético tem que ser expressa através de sua massa molar média (MW). A massa molar média de um polímero pode ser definida e calculada de várias maneiras, de acordo com o método experimental usado [55]. Este parâmetro deve ser calculado usando-se métodos estatísticos que melhor definam a população de moléculas do polímero. Basicamente, o MW pode ser calculado através de:

- a massa molar ponderal média (M_w) que é a média ponderada ou a soma das massas vezes a massa molar de todas as moléculas dividida pela massa total da mistura;
- a massa molar numérica média (M_n) é a média aritmética ou a soma das massas molares de todas as moléculas da amostra, dividida pelo número de moléculas na amostra. O valor de M_n está relacionado à flexibilidade e pegajosidade de um polímero e é função da quantidade de material de baixa massa molar.

Outros parâmetros de massa molar média definidos para estudos de SEC são a massa molar viscométrica média (M_v) e a massa molar do z -médio (M_z). O primeiro está relacionado à viscosidade média do material em solução e o segundo está relacionado à presença de fraturas no polímero e à quantidade de componentes de alta massa molar [55]. Os estudos de SH geralmente adotam os valores M_w e M_n como parâmetros de dimensão molecular.

A massa molar ponderada pela média (M_w) e a massa molar ponderada pelo número (M_n) podem ser calculadas usando as seguintes equações [60]:

$$M_w = \sum h_i M_i^2 / \sum h_i M_i \quad (2)$$

$$M_n = \sum h_i M_i / \sum h_i \quad (3)$$

M_i e h_i são as massas molares e a altura de cada i -ésima fração eluída ao i -ésimo volume no cromatograma, respectivamente. M_w e M_n podem ser calculados usando-se “softwares” dedicados aos sistemas operacionais.

Se o polímero é uma amostra perfeitamente uniforme é dito monodisperso e então todos os valores médios de massas molares são equivalentes. Portanto, a razão entre M_w e M_n é a medida da dispersividade da distribuição de massas molares na amostra do polímero e é chamada de polidispersividade (P), a qual é definida pela equação 4:

$$P = M_w / M_n \quad (4)$$

Quanto mais próximo a 1, menor a polidispersão do material húmico e menor é a distribuição de tamanho molecular da amostra. A polidispersividade de SH é geralmente maior que 1,5 [14,55] o que sugere que a MO é um agrupamento de moléculas de diversos tamanhos.

2.5.2.2. *Preparo de amostras húmicas para cromatografia de exclusão*

Geralmente os AH extraídos por procedimentos alcalinos são pouco solúveis nos eluentes a pH 7 comumente usados na análise por HPSEC, tais como sais (NaCl , NaNO_3) ou tampões fosfato [44]. Para minimizar este problema, as amostras sólidas de AH são suspensas em água destilada, tituladas a pH 7 com solução de NaOH ou NH_4OH para melhor solubilização. Os AH na forma de seus humatos são preferidos na cromatografia, pois a formação do par iônico exclui a ocorrência ocasional de cargas negativas nas moléculas dissolvidas na fase móvel [60]. Assim, a densidade de carga de cada amostra de SH será a mesma, a menos que se altere a composição iônica da fase móvel.

A faixa de concentração usual para HPSEC está entre 0,2 a 0,6 g L⁻¹ no correspondente eluente, para evitar efeito de solvente o qual poderia resultar no aparecimento de picos alargados (tipo corcova) ao redor do V_i da coluna [44].

A concentração da amostra é uma das variáveis operacionais mais importantes em SEC, porque é conhecido o fato que o volume de retenção do polímero aumenta com a concentração da amostra [55]. A dependência entre concentração e volume de retenção é um fenômeno bem conhecido e a magnitude do deslocamento do pico a um volume de retenção mais alto é mais pronunciado para polímeros com massas molares mais altas do que para aqueles de massas molares mais baixas. Isto é observado mesmo a concentrações muito baixas como 0,01% (m/v), embora o deslocamento do pico seja menor que a concentrações mais altas. Geralmente este efeito não ocorre em polímeros com massas molares menores que 10.000 Da. A explicação para a alteração no volume de retenção em diferentes concentrações do polímero está relacionada as alterações no volume hidrodinâmico das moléculas de polímeros na solução [55].

A estrutura secundária das SH, quando em solução, é dependente não somente do pH e da força iônica do solvente, mas também da sua concentração. SH são consideradas como novos moleculares contraídos em valores baixos de pH ou em alta força iônica. As mudanças no volume ou tamanho molecular das SH são usualmente explicadas pela natureza macropolimérica de sua estrutura, onde ligações intermoleculares de hidrogênio e interações hidrofóbicas aumentam com o tamanho molecular das unidades de moléculas húmicas [61, 62].

Em pesquisa recente, Wershaw [12] propôs que a formação de micelas estaria sujeita a um limite mínimo de concentração, denominado concentração micelar crítica (CMC). A CMC depende da natureza do surfactante em questão, e, em diferentes graus, das condições da solução, tais como a força iônica, temperatura e presença de outros solutos [21]. A concentração de $0,05 \text{ g L}^{-1}$ representa o limite entre a suposta forma enovelada e a forma linear coloidal das SH, enquanto que a concentração de 10 g L^{-1} é relatada como aquela na qual as SH começam a formar estruturas micelares em solução [21,61].

Sobre superfícies minerais do solo, as SH formariam bicamadas nas quais as partes hidrofóbicas das moléculas anfifílicas constituiriam o interior da membrana de bicamada e o exterior da superfície destas membranas seriam compostas de partes hidrofílicas das moléculas. Para SH dissolvidas, este modelo seria mais difícil de aplicar porque a concentração das SH em águas naturais é geralmente muito mais baixa do que os valores de CMC medidos para SH isoladas. Os aumentos na solubilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos em águas naturais indicam que estes compostos estão interagindo com algum tipo de fase hidrofóbica [12].

Finalmente, a combinação das informações obtidas das técnicas cromatográficas com aquelas obtidas de espectroscopias potencializa grandemente a interpretação das conformações estruturais, os tipos de associações com espécies metálicas, a natureza dos principais grupos orgânicos funcionais presentes nas estruturas das frações húmicas.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações químicas ocorridas no material durante a compostagem da mistura de serragem de *Pinus taeda* e lodo biológico proveniente de fábrica de celulose de *Pinus*.

A compostagem foi escolhida por ser um sistema de humificação sob condições controladas, propiciando a formação de um húmus menos heterogêneo e a partir de materiais de partida bem caracterizados quimicamente. Este material relativamente homogêneo foi usado para estudar o processo de humificação, através da caracterização espectroscópica (ressonância paramagnética eletrônica, ressonância magnética nuclear, infravermelho com transformada de Fourier e ultravioleta-visível) e de cromatografia de exclusão por tamanho das frações ácido húmico, ácido fúlvico e humina. Entre as diferentes características químicas determinadas, pretendeu-se identificar padrões químicos no composto que se correlacionem com sua maturidade.

Finalmente, pretendeu-se ainda avançar no conhecimento dos principais processos químicos envolvidos na formação de substâncias húmicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL DE PARTIDA

O lodo biológico (LO) foi obtido da estação de tratamento de efluentes da fábrica da Iguaçu Celulose Ltda., em Pirai do Sul, onde este resíduo é prensado e desaguado a um teor de umidade em torno de 60% (m/v). A serragem de *Pinus taeda* foi obtida em serraria comercial no município de Colombo. Ambos materiais foram misturados em volumes iguais, através de misturador rotativo.

A caracterização química do lodo foi feita no Laboratório de Processos e Projetos do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). 200 g do lodo foram extraídas com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila, acetona e etanol), em aparelho Soxhlet, como tratamento de pré-purificação, obtendo-se assim, três extratos orgânicos: hexano, acetato de etila, acetona e etanol. Após a purificação, as frações AH e HU, foram extraídas do lodo após o fracionamento sequencial, pelo método sugerido pela International Humic Substances Society (IHSS) [63], conforme descrito no capítulo 4.3.

4.2. COMPOSTAGEM

A compostagem da serragem-lodo foi realizada em reatores de batelada da Usina de Tratamento de Resíduos Sólidos da Tibagi Sistemas Ambientais Ltda, São José dos Pinhais, PR. O sistema de compostagem adotado foi do tipo KNEER®, que consiste de um reator de 13 m³ de capacidade (Figuras 8 e 9) onde o resíduo foi confinado e monitorado continuamente por sensores de temperatura e oxigênio, através de um computador, para controle do regime intermitente de aeração, produzida por compressão de ar. O resíduo foi mantido nos reatores por 15 dias sob aeração. Aos 2 dias do início do processo, a temperatura atingiu cerca de 65°C. Aos 10 dias a temperatura estabilizou em torno de 40°C. Aos 15 dias, o composto foi transferido para o pátio de maturação por mais 15 dias. Foram tomadas três amostras simples, em diagonal à profundidade média da altura do reator (2,5 m), aos 0 (A₀), 2 (A₁), 8 (A₂), 15 (A₃), 22 (A₄) e 29 (A₅) dias de compostagem.

FIGURA 8 - ESQUEMA DO PROCESSO KNEER EMPREGADO NA COMPOSTAGEM DA MISTURA LODO-SERRAGEM.

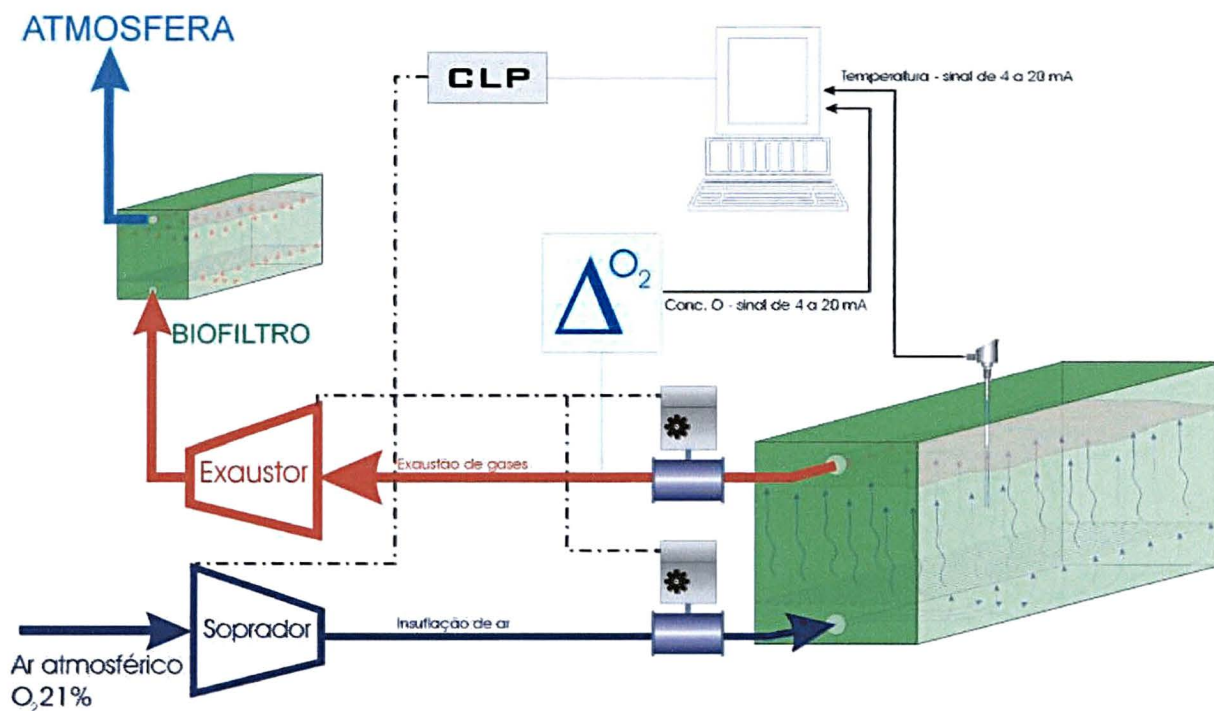


FIGURA 9 - VISTAS DOS REATORES DE COMPOSTAGEM COM O SISTEMA DE AERAÇÃO, NA TIBAGI AMBIENTAL, SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR.



4.3. EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES HÚMICAS

Os ácidos húmicos (AH) foram extraídos do composto com o mesmo método usado para o lodo [63], conforme o seguinte procedimento:

- 100 g de amostra foram acidificadas com HCl 1 mol L⁻¹ até pH entre 1 e 2, e o volume da solução foi ajustado com HCl 0,1 mol.L⁻¹ de modo a se obter uma concentração final de 10 mL de líquido/g de amostra seca;
- a solução foi agitada por 1 h e filtrada e a fração solúvel (ácidos fúlvicos, AF) foi descartada. O resíduo sólido foi neutralizada com NaOH 1 mol L⁻¹ até pH 7, ajustando-se o volume da solução com NaOH 0,1 mol L⁻¹, sob atmosfera de N₂, até se obter uma relação extrator / amostra de 10:1;
- após 14 h de repouso, a solução foi agitada por 4 h e centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi acidificado com HCl 6 mol L⁻¹ até pH 1 sob agitação e decantado por 14 h para precipitação dos AH. O resíduo sólido remanescente nos tubos de centrifugação (HU) foi seco a 60° C;
- os AH precipitados foram centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos e redissolvidos em um volume mínimo de KOH 0,1M sob atmosfera de N₂; adicionou-se KCl até concentração de 0,3 mol L⁻¹ (K⁺) e centrifugou-se com o objetivo de remover cinzas e suspensões sólidas;
- os AH foram reprecipitados com HCl 6M sob agitação até pH 1,0, decantados por 14 h e depois centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o resíduo (AH) lavado com HCl 0,01mol L⁻¹ e seco à 60° C.

As frações AH e HU foram estudadas por RPE, RMN de ¹H e ¹³C, IVTF e UV-vis. As análises de RPE foram feitas em um aparelho Bruker ESP 300E, na banda X (~9.7 GHz), com frequência de modulação de campo magnético de 100 kHz e amplitude de modulação de 2.024 G para os espectros a 50 G e cerca de 11 G para os espectros a 5000 G. As amostras líquidas foram analisadas em células flat e as sólidas em tubos de quartzo. O teor de radicais livres foi quantificado pela aproximação intensidade × largura de linha ao

quadrado [64]. As áreas dos picos dos espectros foram calibradas com o sinal correspondente do padrão de "weak pitch" (Bruker). O mesmo padrão foi ($g = 2,0028$) foi usado para corrigir os valores do fator g .

Os espectros de RMN de ^1H das amostras líquidas dos extratos orgânicos extraídos do lodo foram obtidos à temperatura ambiente e registrados em equipamento AC-80 Bruker, do DQ/UFPR, em CD_3Cl e os espectros de RMN de ^{13}C do AH do lodo foram feitos em espectrofotômetro AC-400 Bruker, do Departamento de Bioquímica da UFPR, em D_2O e sódio metálico. Os deslocamentos químicos (ppm) foram referenciados com tetrametilsilano (TMS).

As análises de RMN de ^{13}C CPMAS das amostras sólidas de AH do composto foram feitas no CENPES, Petrobrás, Rio de Janeiro. Os espectros foram obtidos em aparelho Varian Inova 300 MHz, equipado com sonda para sólidos (MAS), na frequência de 75,5 MHz, velocidade de rotação de 4.5 kHz, intervalo entre pulsos de 2s, 2000 transientes, duração do pulso 4,6 μs (90°) e tempo de contato de 1 ms, para o primeiro experimento. Em um segundo experimento, os espectros de ^{13}C CPMAS foram usados juntamente com os espectros obtidos da sequência de pulsos de defasagem dipolar (DD), nas seguintes condições: tempo de contato de 5 ms, pulso de 4.5 μs e potência de pulsos de ^{13}C calibrados para atingir a condição de Hartmann-Hahn, velocidade de rotação no MAS de 5.5 KHz e 12000 transientes. Os espectros de ^{13}C CPMAS-DD foram obtidos nas mesmas condições que os de CPMAS usando-se um tempo de 60 μs para a janela de desligamento do desacoplador. Os espectros foram processados com largura da banda de 100 Hz e correção de linha base. As áreas dos picos foram integradas usando-se os mesmos critérios para todas as amostras e o hexametilbenzeno (HMB) foi usado como referência dos deslocamentos químicos.

Todos os espectros de IVTF das amostras foram obtidos em pastilhas de KBr (99 g de KBr mg^{-1} de amostra) e registrados em aparelho Bomen FTIR MB 100, do Departamento de Química da UFPR. Os espectros de UV-vis foram registrados no mesmo local, em equipamento Shimadzu 2401PC, de amostras em solução, usando o solvente correspondente como branco para os extratos orgânicos e 1,5 mg de AH em 10 mL de NaHCO_3 0,05 mol L^{-1} . A razão E_4/E_6 foi calculada pelas intensidades de absorção a 465 e 665 nm. Todos os espectros foram normalizados.

4.4. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DAS FRAÇÕES HÚMICAS

A análises de HPSEC foram realizadas no Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, e dell'Ambiente da Università di Napoli Federico II, em Portici, Itália. As frações húmicas, obtidas de amostras de composto lodo-serragem produzido no Brasil, foram extraídos com solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, de acordo com a metodologia usada por Piccolo e colaboradores [44]. Os ácidos húmicos (AH) foram precipitados a $\text{pH} \sim 1$ com HCl concentrado e purificados através de três ciclos de dissolução em NaOH seguidos por re-precipitação em HCl. Os AHs foram tratados com solução de HCl-HF, dialisados em água destilada até estar isento do íon cloreto (Cl^-). O HF é utilizado para a remoção de cinzas devido a sua capacidade de dissolver minerais de argilas, formando complexo solúvel com o silício [65].

Os ácidos fúlvicos (AF), a fração que fica em solução após a primeira precipitação dos AH em $\text{pH} 1$, foram purificados usando resina Amberlite XAD-8, eluídos com solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH, dialisados e liofilizados. A XAD-8 é uma resina de polimetil-metacrilato, que atua como trocadora fraca de cátions e que, no caso do fracionamento de SH, funciona principalmente pelo mecanismo de cromatografia de adsorção. Esta resina adsorve componentes hidrofóbicos e as SH, que estão na forma não iônica sob condições de valores de pH em torno de 2, ficam retidas na coluna. Polissacarídeos, sais e outras substâncias presentes no extrato, com suficiente número de grupos funcionais polares para não serem adsorvidas, serão lavadas da resina em meio ácido e constituem a fração ácida hidrofílica. Quando o valor do pH é elevado, os grupos ácidos das SH começam a se dissociar e não mais se aderem à resina. Na prática, os ácidos fúlvicos são eluídos da coluna XAD-8 com álcali diluído [18]. A humina (HU) foi também tratada duas vezes com a solução 10% (v/v) HF por 48 h, e extraída como os AHs, dialisada e liofilizada. O teor de cinzas das amostras de AH não excedeu a 5% (m/m).

Para obtenção dos humatos de sódio, os AH liofilizados foram dissolvidos em água deionizada decarbonatada (20 mg por 70ml) e titulados com solução NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} 8$ por no mínimo 4 horas ou até atingir a estabilização do pH por 2 horas consecutivas, em titulador automático (VIT90 Videotitrator, Radiometer, Copenhagen), sob agitação constante e fluxo de N_2 . A titulação ao $\text{pH} 8$ foi feita porque em $\text{pH} 7$ os humatos

permaneciam ainda parcialmente insolúveis e a estabilização do pH não foi atingida. Este fato pode ser explicado pela natureza fenólica dos AH extraídos do composto e do lodo biológico, conforme demonstrado anteriormente por Budziak et al. [66]. O mesmo procedimento foi usado para a obtenção dos humatos de amônio, porém utilizando-se solução de NH_4OH 5% (v/v), preparada a partir da diluição de NH_3 a 30% (v/v). Os humatos de sódio e amônio foram congelados e liofilizados para a cromatografia.

O eluente usado foi tampão fosfato a pH 7 preparado com solução 0,1 M NaH_2PO_4 e 0,1 M NaOH para ajuste do pH. Azida de sódio (NaN_3) a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ foi usada como bacteriostático. O fluxo do eluente foi sempre de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e a pressão foi mantida constante. Todas as amostras foram analisadas em pH 7 (tampão fosfato) e em pH 4,5 (tampão fosfato mais ácido acético glacial para ajuste do pH) em dois sistemas HPSEC:

- HPSEC UV-IR, que consistiu de uma bomba Shimadzu LC-10ADVP com injetor rotatório Rheodine (com loop de $100 \mu\text{L}$) e dois detectores em série (um detector Perkin Elmer (PE), de UV-Vis, de comprimento de onda variável, comprimento de onda ajustado em 280 nm, modelo PE LC-295, e um detector de índice de refração (IR), Fisons Instrument, Refractomonitor IV);
- HPSEC UV-F, que consistiu de uma bomba de alta pressão PE LC200 com injetor rotatório Rheodine (com loop de $100 \mu\text{L}$) e dois detectores em série (um detector UV Gilson, com comprimento de onda ajustado em 280 nm e um espectrômetro de fluorescência, modelo PE LS-3B, com comprimento de onda ajustado em 290 nm para excitação e 610 nm para emissão).

Nos dois sistemas foram usadas interface PE-Nelson 900 Series e coluna Polysep GFC-P3000 (Phenomenex, Torrance, CA, USA), precedida por uma coluna-guarda Polysep GFC. A faixa de pH de trabalho da coluna é de 3 a 12 (definida pelo fabricante) e o limite de exclusão para PEG é de $5 \times 10^4 \text{ Da}$ (limite para PSS não informado pelo fabricante).

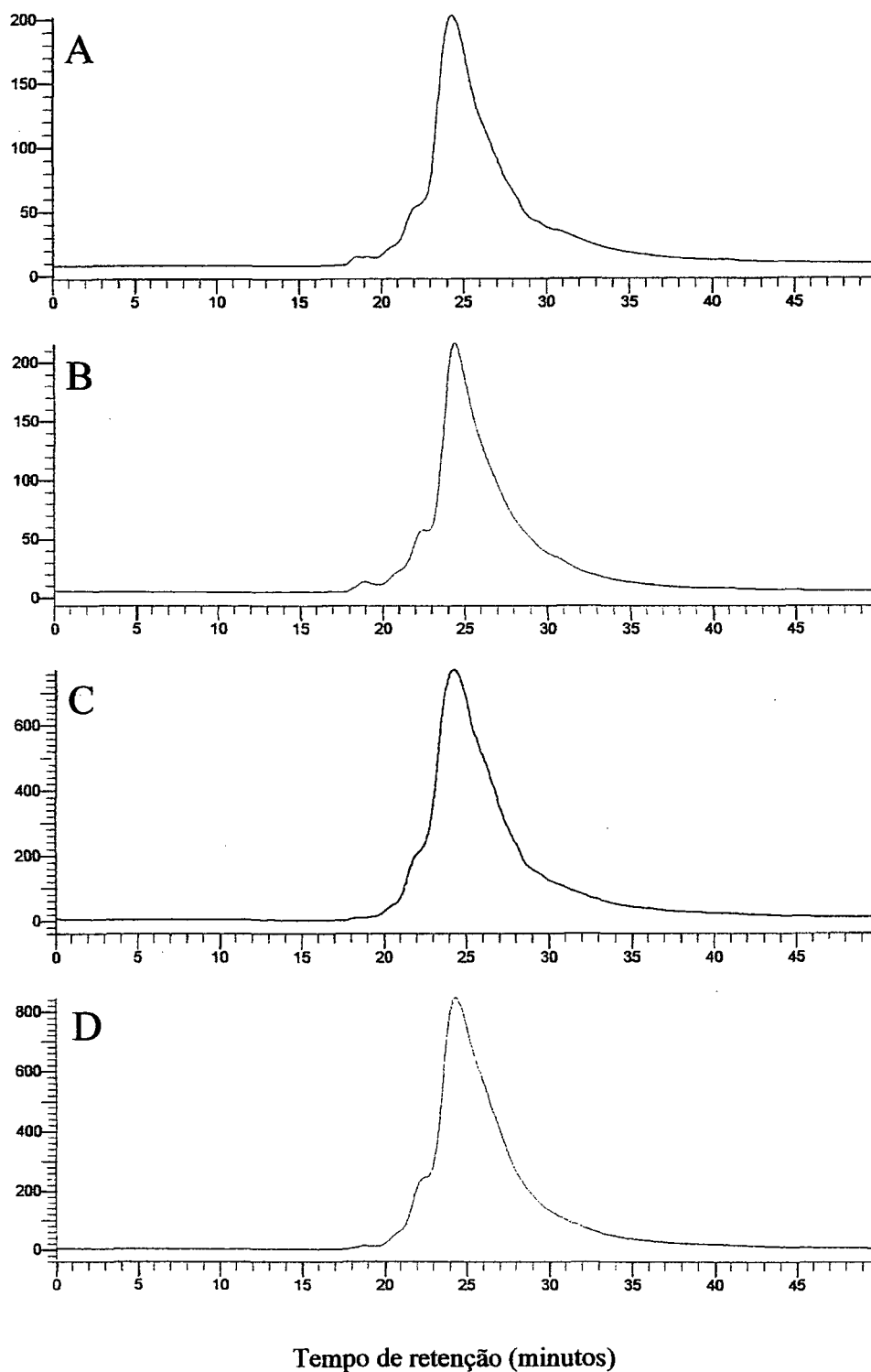
Para testar se o ácido acético teria algum tipo de interação com a coluna, a mistura dos padrões PSS foi injetada usando-se o eluente nos valores de pH 7 e de 4,5 (tampão

fosfato e tampão fosfato + ácido acético glacial, respectivamente). Os cromatogramas obtidos mostraram perfeita sobreposição (Figura 10).

Blue Dextran foi usado para a determinação do volume morto da coluna (V_0) e H_2O (sistema HPSEC UV-IR) e metanol (sistema HPSEC UV-F) para a determinação do volume total da coluna (V_t). O V_0 calculado foi igual a 11,2 mL e o V_t foi de 24,4 mL.

Poliestirenosulfonatos (PSS) (Polymer Standard Services, Alemanha) de massas molares conhecidas (32, 16,8, 6,78, 4,3 e 1,1 KDa) foram usados para construir a curva de calibração. Os PSS foram dissolvidos na solução eluente (2 g L⁻¹) e imediatamente filtrados através de filtro 0,45 μ m (PVDF Millipore) e injetados em três replicatas por amostra. O tempo de análise foi de 60 minutos. Os cromatogramas do tamanho molecular das SH foram processados através do software Turbochrom 4-SEC (PE Nelson) para a integração de picos e cálculo de massa molar. O mesmo procedimento foi conduzido no sistema HPSEC UV- Fluorescência. Os cálculos da massa molar ponderal média (M_w), massa molar numérica média molecular (M_n) e polidispersividade (M_w/M_n) foram feitos utilizando-se o método Hamielec de calibração. Este método cria uma tabela de posição do pico da distribuição molecular de um ou mais padrões, cuja média de massa molar é conhecida (M_w , ou M_n). Esta informação pode ser derivada por alguma outra técnica tal como “low-angle light scattering”, ou pode ser derivada da análise do padrão como se fosse uma amostra. A calibração Hamielec usa um algoritmo de otimização simplex para repetidamente obter resultados usando uma triagem de ajuste de calibração, até a média da massa molar concordar com as médias de massas molares dos padrões. Quando os ajustes da curva não linear são selecionados, ao menos duas médias de massas molares precisam ser conhecidas [67]. Foram usados, portanto, cinco pontos na curva de calibração, obtidos a partir dos tempos de retenção dos padrões PSS.

FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS DA MISTURA DE PADRÕES DE POLIESTIRENOSULFONATOS DISSOLVIDA EM TAMPÃO FOSFATO pH 7 E EM SOLUÇÃO FOSFATO COM ÁCIDO ACÉTICO E pH 3,5 - SINAIS DO DETECTOR UV-VIS E DO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.



A = padrões pH 3,5 (UV-vis); B = padrões pH 7 (UV-vis);
C = padrões pH 3,5 (índice de refração); D = padrões pH 7 (índice de refração)

4.4.1. EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS

4.4.1.1. *Efeito do tempo de compostagem sobre a conformação de substâncias húmicas.*

As amostras dos humatos e dos ácidos fúlvicos obtidos do composto a diferentes tempo de compostagem ($A_0 - A_5$) foram estudadas em ambos sistemas cromatográficos e objetivou comparar as variações conformacionais das frações húmicas ao longo da compostagem. A concentração das amostras foi de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ nas análises feitas no sistema HPSEC UV-IR e de 2 g L^{-1} nas análises feitas no sistema HPSEC UV- F.

4.4.1.2. *Efeito do pH sobre a estrutura conformacional das substâncias húmicas.*

Este experimento foi feito em ambos sistemas cromatográficos e confrontou as variações conformacionais das frações húmicas em pH ácido, com aquelas verificadas em pH 7. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente e a cada uma, adicionou-se ácido acético glacial com microseringa, até ajustar o valor do pH em 4,5, usando-se potenciômetro.

4.4.1.3. *Efeito da concentração sobre a estrutura conformacional de substâncias húmicas.*

Este estudo foi realizado no sistema HPSEC UV-IR e as amostras de AF de lodo biológico foram analisados nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3 0,4, 0,5 0,6 e $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Os AH foram estudados nas seguintes concentrações: de 0,1, 0,2, 0,3 0,4, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$.

4.4.1.4. *Efeito do contra-íon sobre a estrutura conformacional de humatos*

Este estudo comparou os tamanhos moleculares aparentes dos humatos de sódio e de amônio, em ambos sistemas, na concentração de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ (HPSEC UV-IR) e de 2 g L^{-1} (HPSEC UV-F).

4.4.2. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS

As frações húmicas foram isoladas no Laboratório do Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, e dell'Ambiente foram analisadas por espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Perkin Elmer Spectrum One) com acessório para refletância difusa (DRIFT), da Università di Napoli Federico II. As amostras foram diluídas a 2% em KBr. Tomou-se 16 varreduras espectrais por amostra.

As frações húmicas foram trazidas para o Departamento de Química da UFPR onde ainda foram feitas análises de ressonância paramagnética eletrônica em equipamento da Bruker ESP 300E, conforme condições mencionadas anteriormente [68]. As frações AH, AF e HU foram analisadas no estado sólido em tubos de quartzo, à temperatura ambiente e a 77 K, sob nitrogênio líquido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LODO BIOLÓGICO

5.1.1. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Os valores de g dos radicais livres orgânicos (RLO) variaram de 2,0022 (extrato hexano, HE) a 2,0042 (extrato acetato de etila, ACE) (Tabela 2, Figura 11). Com exceção do extrato HE, os valores de g são típicos de radical livre próximo a heteroátomo em estruturas orgânicas, possivelmente de estruturas de *orto*- e *para*- semiquinonas. O número de spin/g das amostras sólidas, aumentou na seguinte ordem: LO < HU < AH. Em SH, as estruturas de *orto*- e *para*- semiquinonas estão em equilíbrio com seus correspondentes *orto*- e *para*- bifenóis e os grupos *orto*-bifenóis formam quelatos com íons metálicos [64]. Os espectros de RPE do LO (Figura 11a) e de AH (Fig. 11c) mostraram sextetos de linhas de absorção de esfera externa de complexo de íon de Mn^{2+} $[Mn(OH_2)_6]^{2+}$ - matéria orgânica, com $g = 2.00$ e interação hiperfina com $A = 82,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, em ambas as amostras.

TABELA 2 - PARÂMETROS ESPECTRAIS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS, ÁCIDO HÚMICO (AH), HUMINA (HU) E LODO (LO).

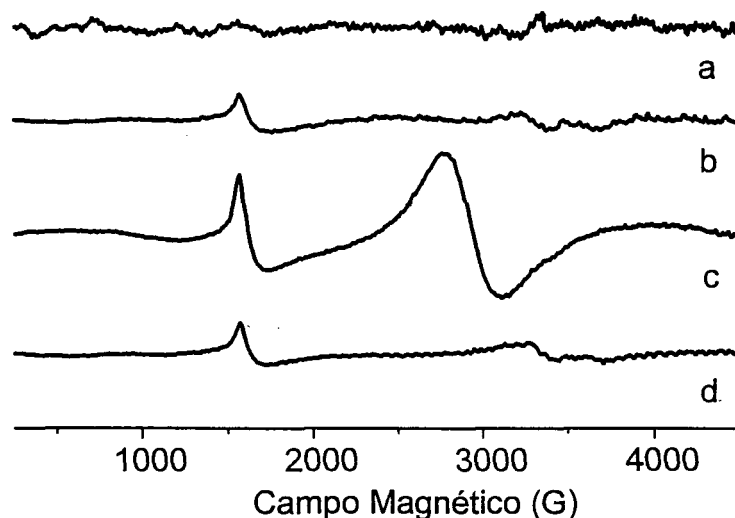
Amostra	g			$\Delta H_{pp}(G)$ $g \sim 2,000$		A 10^{-4} cm^{-1}	Spin g^{-1}
	Fe^{3+}	Mn^{2+}	RLO	Fe^{3+}	RLO		
Extrato Hexano	ND	ND	2,0022	ND	3,56	ND	ND
Extrato Acetato Etila	4,3; 9,0	ND	2,0042	ND	6,86	ND	ND
Extrato Acetona	2,3; 4,3; 9,0	ND	2,0027	395	1,53	ND	ND
Extrato Etanol	4,3; 9,0	ND	2,0037	ND	5,35	ND	ND
AH	4,3; 9,0	2,0	2,0034	ND	5,05	82,2	$5,7 \times 10^{15}$
HU	2,3; 4,3; 9,0	ND	2,0034	177	7,41	ND	$2,6 \times 10^{15}$
LO	2,1; 4,3; 9,0	2,0	2,0037	915	6,82	82,2	$1,2 \times 10^{15}$

RLO = radical livre orgânico; g = fator g ; $\Delta H_{pp}(G)$ = largura de linha em Gauss; A = constante de acoplamento hiperfina em $\text{cm}^{-1} (\times 10^4)$; Spin g^{-1} = número de spins por grama; ND=não detectado.

Para visualizar as linhas do sexteto do Mn^{2+} , das amostras do LO, obteve-se a segunda derivada do espectro (Figura 12, inserção a'). A magnitude da constante hiperfina A' , relaciona-se com o grau de ligação covalente do íon Mn^{2+} em seus complexos. O valor A de $82,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ indica a ocorrência de cerca de 20% de caráter covalente na interação do Mn^{2+} com a matéria orgânica e com o AH do LO [69]. Com exceção do extrato HE, todas as amostras mostraram sinais de Fe^{3+} em alto spin ($S=5/2$), complexado em estruturas octaédricas distorcidas e/ou tetraédricas, em coordenação rômica ($g_1 = 4,3$; $g_2 = 9,0$) [64].

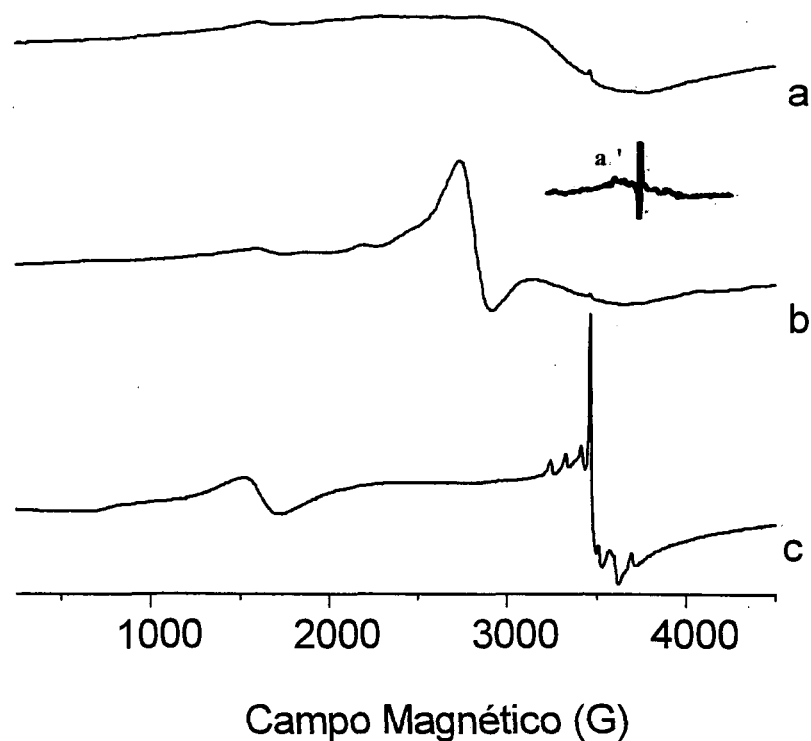
Os espectros de LO, HU e extrato acetona (AC) mostraram uma linha larga de absorção centrada em $g \approx 2$, o espectro de LO (Figura 11) apresentou uma linha larga com $g = 2,1$ e $\Delta H_{pp} = 915 \text{ G}$ e os espectros de HU e do extrato acetona mostraram linhas mais estreitas com $g = 2,3$. Estes padrões de absorções correspondem a linhas sobrepostas de acoplamento spin-spin (interação dipolar), proporcional a r^{-3} , onde r é a distância entre dois dipolos magnéticos [64]. As linhas largas ocorrem tanto devido à presença de íons metálicos paramagnéticos, que absorvem na mesma região do campo, quanto à proximidade de dipolos magnéticos.

FIGURA 11 - ESPECTRO DE RPE DOS EXTRATOS ORGÂNICOS A 77 K, A 5000 G: HEXANO (A), ACETATO DE ETILA (B), ACETONA (C) E ETANOL (D).



Baseado nos espectros (Figuras 11 e 12) e nos parâmetros obtidos, sugere-se que estas linhas ($g = 2.0$) são devidas a íons Fe^{3+} em concentração alta nas amostras de LO, concentração baixa no extrato AC e concentração muito baixa na HU. A linha de absorção de Fe^{3+} no LO corresponde a linhas sobrepostas devido a grande concentração de ferro trivalente nestas amostras [70]. Nas amostras extrato acetona e HU, porém, as linhas mais estreitas foram possivelmente devidas à presença complexos de íons Fe^{3+} em estrutura quasi-octaédrica [71].

FIGURA 12 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DAS AMOSTRAS LODO (A), HUMINA. (B) E ÁCIDO HÚMICO (C) (~300 K) A 5000



5.1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os dados espectrais de RMN- ^1H de amostras líquidas dos extratos orgânicos (Tabela 3) mostraram picos intensos em $\delta=0.5\text{-}2.0$ ppm (CH , CH_2 e CH_3 alifáticos) e picos menos intensos em $\delta=7.0\text{-}8.0$ ppm ($\text{Csp}_2\text{-H}$ aromático) e $\delta = 5.1\text{-}5.9$ ppm ($\text{Csp}_2\text{-H}$ não aromático). Todos os extratos mostraram picos em $\delta = 2.0\text{-}2.6$ ppm, indicando a presença de hidrogênio no carbono ligado ao grupo carbonila. As absorções dos extratos acetato de etila, acetona e etanol a $\delta = 3.4\text{-}4.3$ ppm indicam a presença de grupos hidroxí ou amino. Os dados espectrais de RMN- ^{13}C de todas as amostras mostraram características comuns de região alifática (10 a 39 ppm). Picos atribuíveis a carbono secundário ou terciário ligado a átomos de oxigênio ou a átomos de C de amina terciária estavam presente nos espectros dos extratos acetato etila e etanol. O espectro deste extrato mostrou picos a 94 e 105 ppm, provavelmente devido à presença de Csp_2 não-aromático.

TABELA 3 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H E DE ^{13}C (EM PPM) DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO LODO.

Atribuição	Deslocamento químico de RMN- ^1H			
	Extratos			
	Hexano	Acetato Etila	Acetona	Etanol
H aromático	7,0 – 7,2	7,2 – 7,6	6,8 – 8,0	6,9 – 7,8
H-C(sp^2) não aromático	5,1 – 5,3	5,2 - 5,6	5,3 - 5,9	5,1 - 5,4
H-C-X ou H-CH ₂ -X (X=O,N)	nd	3,4 - 4,1	3,4 - 3,9	3,5 - 4,3
-CH ₂ -X, (X= -CONR ₂ , -COOR, -COR)	2,2 - 2,6	2,1 - 2,6	2,6	2,1 - 2,6
-CH, -CH ₂ e -CH ₃ alifático	0,5 - 2,0	0,7 - 2,0	0,8 - 1,6	0,7 - 2,0

Atribuição	Deslocamento químico RMN- ^{13}C			
-C=O de ácido; -C=O de éster	nd	180	----	175
C aromático	125 - 129	122 - 141	----	128 - 150
-C=C-	nd	nd	----	94 - 105
-C-X (X = O,N)	nd	71 - 72	----	71 - 79
-CH ₂ -X, (X= -CONR ₂ , -COOR, -COR)	43 - 47	43 - 57	----	62 - 67
-CH, -CH ₂ -and -CH ₃ - alifático	14 - 39	12 - 39	ND	10 - 39

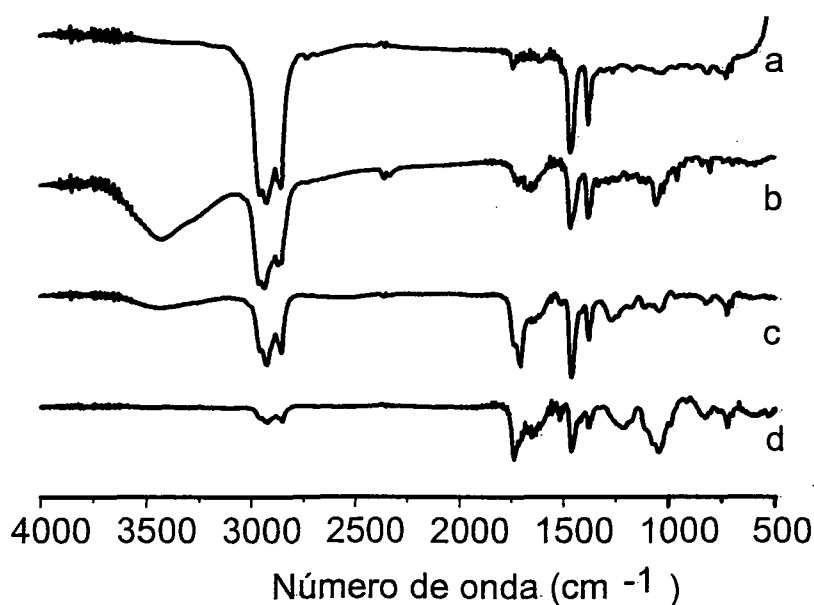
ND = não detectado

Todos os extratos mostraram picos característicos de átomos de carbono aromático (de 122 ppm - C não substituído - a 150 ppm - C substituído). Como confirmado por IVTF, os picos a 175 ppm no espectro do extrato etanol correspondem a grupos carboxílicos e carboxilatos. O pico de absorção a 180 ppm do espectro do extrato acetato de etila pode ser atribuído a traços de carboxilas de ácidos. Devido ao alto conteúdo de Fe^{3+} no extrato acetona, o espectro de RMN- ^{13}C apresentou baixa resolução.

5.1.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO E ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Os espectros de IVTF dos extratos do lodo (Figura 13) foram consistentes com os dados obtidos por RMN. O extrato acetato de etila mostrou um padrão de absorção largo e intenso centrado em 3433 cm^{-1} , atribuído a $\nu(\text{O-H})$ de grupos alcoólicos ou fenólicos. O ombro desta banda a 3250 cm^{-1} pode ser atribuído a $\nu(\text{N-H})$ de grupos amidas ou a $\nu(\text{O-H})$ de H-ligado a grupos fenólicos.

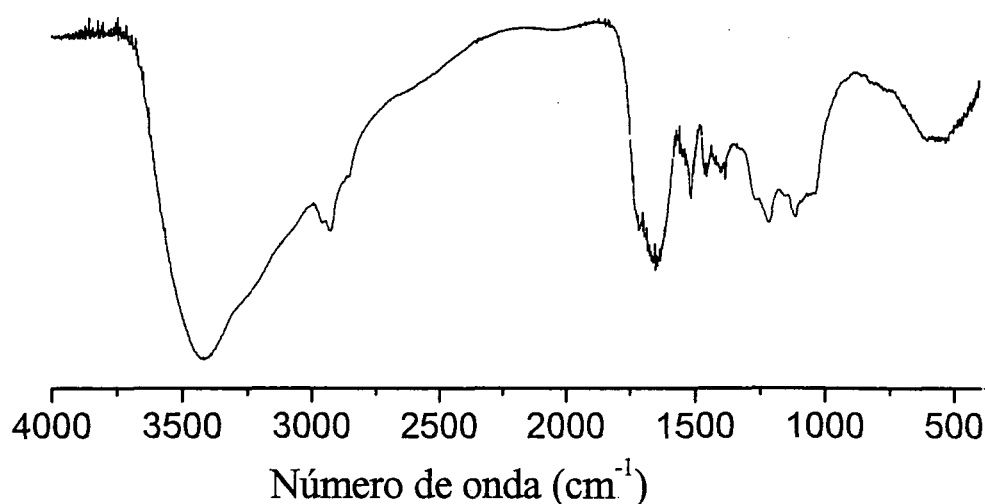
FIGURA 13 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO LO: HEXANO (A), ACETATO DE ETILA (B), ACETONA (C) E ETANOL (D) EM PASTILHA DE KBr.



O extrato acetona mostrou características semelhantes, mas com menor intensidade. Todos os espectros mostraram bandas entre 2956 e 2841 cm^{-1} (estiramento simétrico e anti-simétrico de CH_3 ou CH_2). A intensidade destas bandas e das correspondentes a $\delta(\text{C-H})$ de estruturas alifáticas diminuiu com o aumento da polaridade do solvente. Bandas de absorção entre 1680 e 1737 cm^{-1} devido ao estiramento de C=O de carboxilatos e de ácidos carboxílicos (extrato acetona) e ésteres (extrato etanol) foram notados somente nestes extratos. A banda de absorção intensa a 1680 cm^{-1} , no espectro do extrato acetona, pode ser atribuída a vários grupos (ver descrição do espectro de AH abaixo) incluindo $\nu(\text{O-C=O})$ de Fe^{3+} -coordenado com carboxilatos, o que é consistente com os dados de RPE. A presença de carboidratos somente no extrato etanol foi indicada pela banda (a mais intensa do espectro) a 1028-1036 cm^{-1} .

O espectro de IVTF da amostra de AH (Figura 14) apresentou banda em 3475 cm^{-1} (larga e muito intensa) e o ombro em 3250 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento de O-H fenólico e de grupos carboxílicos. A região de 1730-1600 cm^{-1} é análoga às encontradas nos espectros de IV de actinomicetos e melaninas de fungos, características de AH recém formados [70,71,72].

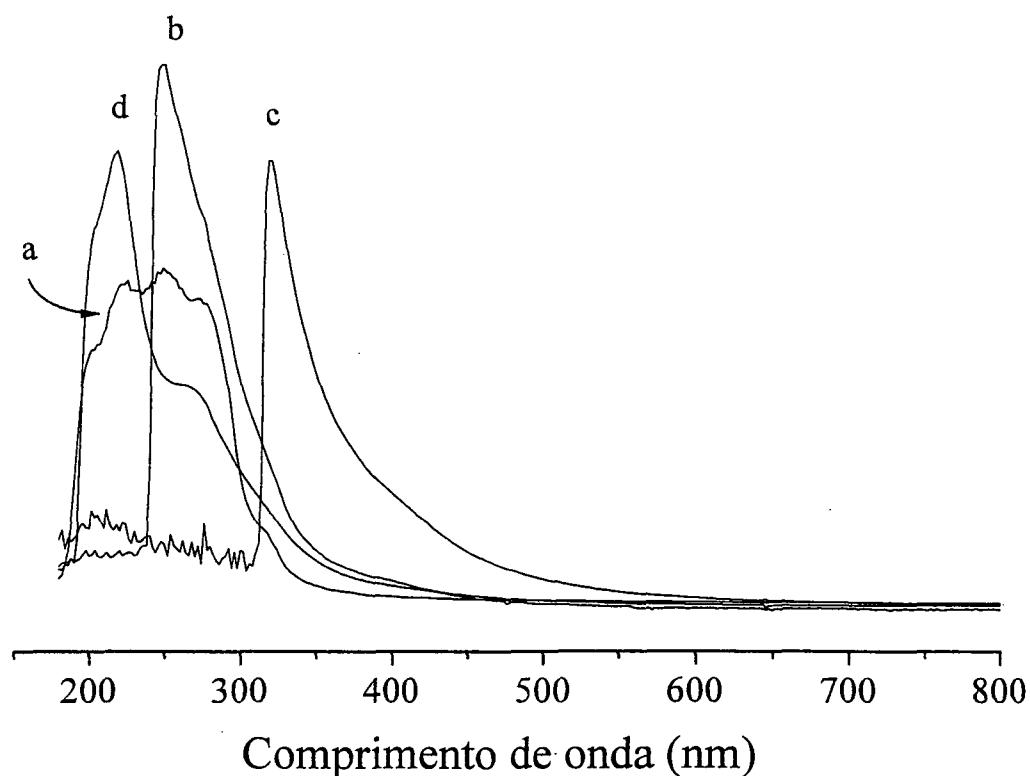
FIGURA 14 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDO DO LODO EM PASTILHA DE KBr



O espectro apresentou ainda, duas bandas parcialmente sobrepostas em 1725 e 1640 cm^{-1} de intensidade moderada. A primeira é atribuída a $\nu(\text{O}-\text{C}=\text{O})$ de ésteres e ácidos carboxílicos ou $\nu(\text{C}=\text{O})$ de cetonas, e a última é atribuída a $\nu(\text{C}=\text{O})$ ou $\nu(\text{C}=\text{O})$ de H-ligado a amidas e $\nu(\text{O}-\text{C}=\text{O})$ de carboxilatos coordenados com metais. A presença de carboxilatos complexados com íons metálicos é consistente com os dados de RPE para Mn^{2+} e Fe^{3+} . A banda em 1030-1080 cm^{-1} indica a existência de carboidratos nas amostras de AH [72].

Os espectros de UV-visível (200 to 800 nm) a temperatura ambiente de cada extrato (Figura 15) mostrou que o hexano removeu constituintes que absorvem luz em comprimento de onda de 224, 245, 270 (máximo de absorbância, λ_{max}) e 293 nm.

FIGURA 15 - ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA-VISÍVEL DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO LO: HEXANO (A), ACETATO DE ETILA (B), ACETONA (C) E ETANOL (D).



A análise cromatografia gasosa com detector de massas (dados não publicados) confirmou que este extrato era constituído por estruturas alifáticas e aromáticas não condensadas. O acetato de etila removeu constituintes com λ_{max} em 270 nm (estruturas aromáticas substituídas, de baixo peso molecular); o extrato acetona teve λ_{max} 342 nm e o etanol removeu substâncias com absorção em 224, 240 (λ_{max}) e 288 nm. Tanto o extrato acetona como o etanólico contém provavelmente, grupos carboxílicos ligados a estruturas de cadeias orgânicas insaturadas e carboidratos.

As absorções do espectro UV-vis do AH, mostraram dois pequenos ombros em 222 e 288 nm. Foi determinada a razão $E_4/E_6 = 3$, onde E_4 e E_6 são as intensidades de absorção em 465 e 665 nm, respectivamente. A faixa esperada desta razão em AH varia de 3 a 5, sendo que razões em torno de 3 indicam um grau mais alto de aromaticidade. Tal valor é esperado para SH recém formadas, derivadas de material lignínico [73].

Os espectros de IVTF e de UV-vis estão consistentes com os resultados de RPE e RMN- ^1H - ^{13}C . A combinação do pré-fracionamento por solventes com RPE, RMN- ^1H e - ^{13}C , IVTF e UV-vis é uma boa estratégia analítica para estudar a mistura complexa de componentes orgânicos e inorgânicos contidos no lodo de fábrica de papel.

Estruturas rômbricas de complexos de Fe^{3+} isotrópico foram identificadas em todos os extratos orgânicos e frações húmicas, exceto no extrato hexano, que é constituído principalmente de estruturas de hidrocarbonetos alifáticos. O conteúdo de estruturas de hidrocarbonetos alifáticos nas frações extraídas diminuiu com o aumento da polaridade do solvente extrator. A fração R-OH da amostra de LO foi extraída predominantemente pelo acetato de etila. Complexos octaédricos de Fe^{3+} foram detectados somente nas frações HU e no extrato acetona. Acetona extraiu mais grupos carboxílicos e carboxilatos. Estes últimos são os grupos doadores de elétrons mais prováveis para formar complexo octaédrico Fe^{3+} na fração orgânica do LO. A interação matéria orgânica- $\text{Mn}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$ é inusitadamente forte, com 20% de carácter covalente. Estes complexos de Mn^{2+} parecem estar concentrados na fração AH do LO.

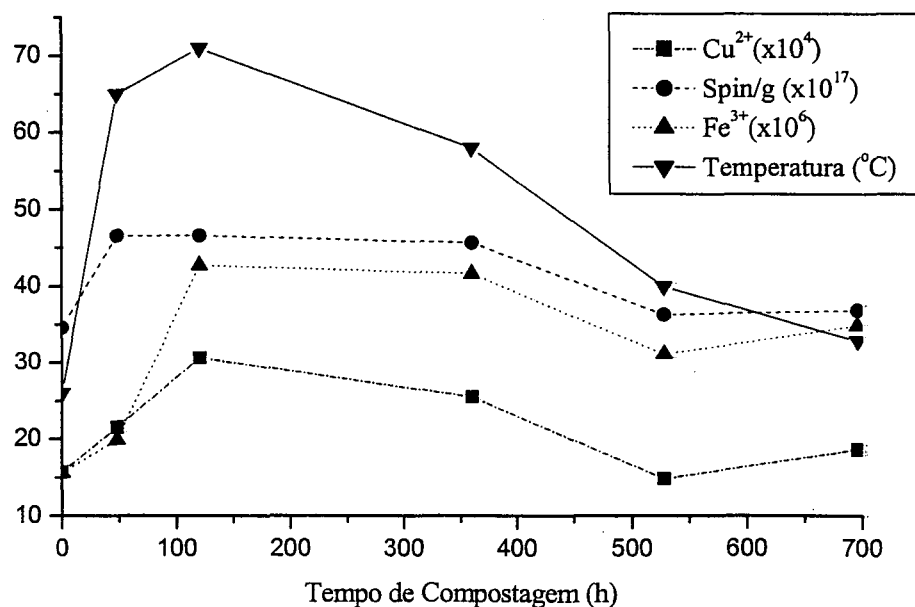
5.2. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DAS SUBSTÂNCIAS HUMICAS DURANTE A COMPOSTAGEM

Os ácidos húmicos extraídos das amostras de composto tomadas ao longo do processo de compostagem foram analisados no Departamento de Química da UFPR, conforme descrito no capítulo Materiais e Métodos (página 32).

Medidas quantitativas de parâmetros de RPE de amostras dos AH do composto em diferentes graus de maturação correlacionaram-se com a concentração de radicais livre orgânicos (RLO) e os conteúdos de ferro e cobre. Entre os vários fatores que influenciam a concentração de RLO, o papel do Cu^{2+} na complexação é particularmente importante e, em geral, a presença de Cu^{2+} está associada à diminuição da concentração de RLO [74]. As amostras dos AH apresentaram valores de g de RLO entre 2,0037 e 2,0039, atribuídos à estruturas de *orto*- e *para*- semiquinonas.

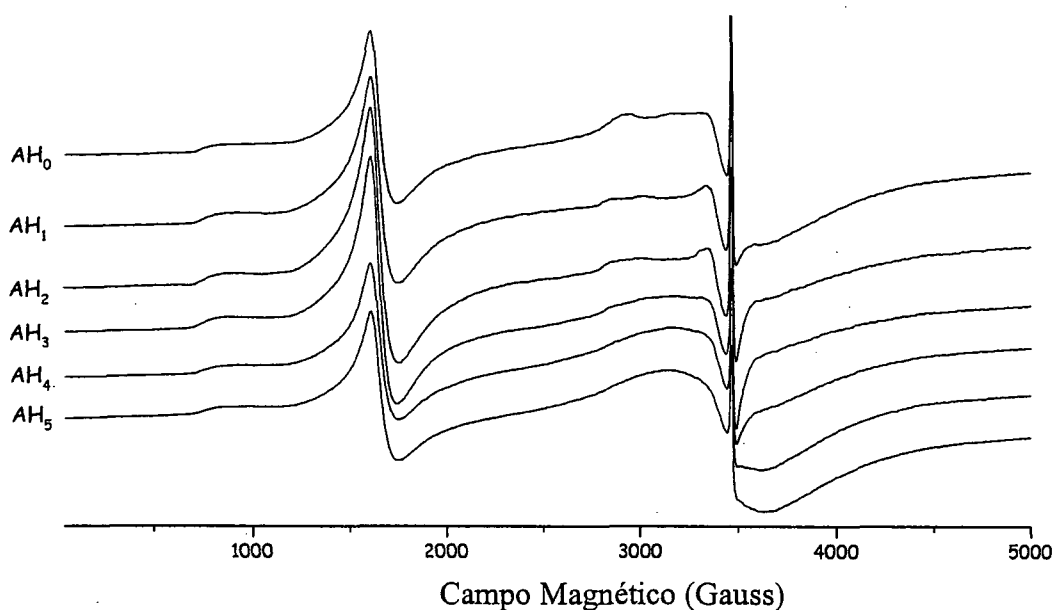
As curvas do número de spin/g, da concentração relativa de Fe^{3+} em domínios diluídos e da concentração de porfirinas de Cu^{2+} ao longo do tempo estão correlacionadas entre si (Figura 16) e mostram um aumento durante a fase termófila da compostagem.

FIGURA 16 - VARIAÇÃO DA TEMPERATURA, DAS CONCENTRAÇÕES RELATIVAS DE Fe^{3+} E DE PORFIRINAS DE Cu^{2+} E DO NÚMERO DE SPIN/G EM AH DO COMPOSTO, EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.



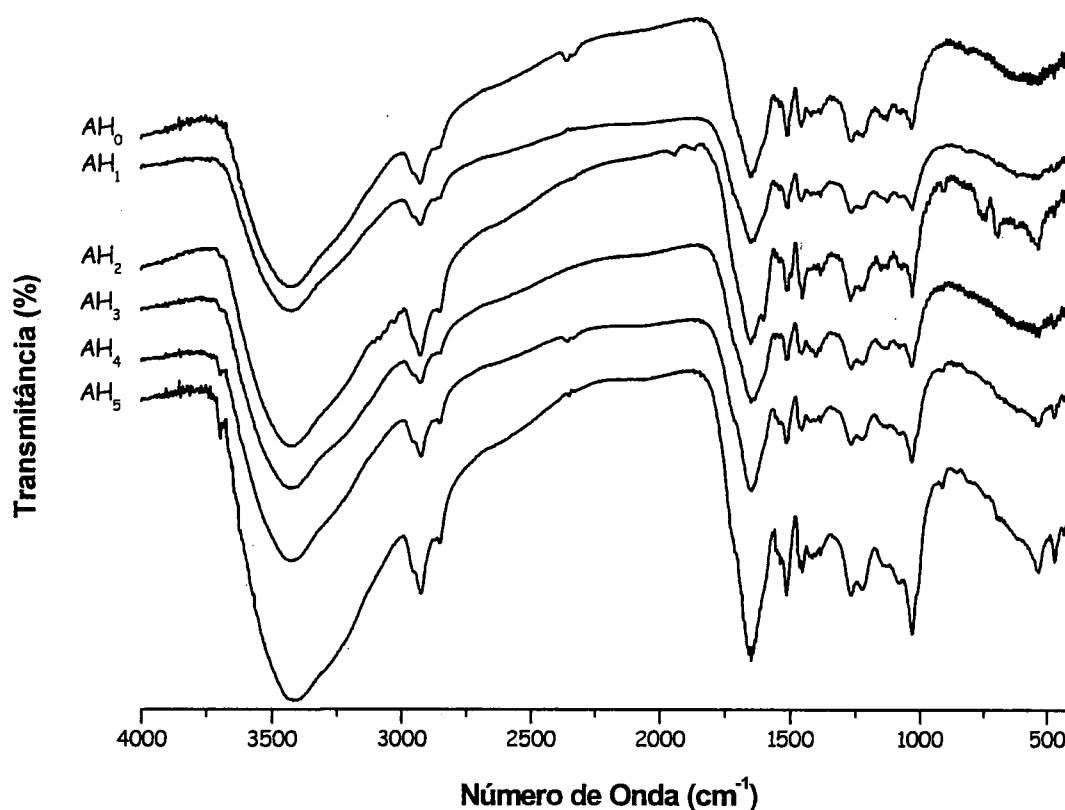
Todas as amostras mostraram evidências de Fe^{3+} em campo baixo, com fator g em 4,3 e em 9,0 e em campo alto, com linhas de g $\sim 2,3$ (Figura 17). Os espectros a 77 K apresentaram linhas mais intensas nos domínios diluídos e menos intensas nos domínios concentrados de Fe^{3+} . As amostras A_0 , A_1 , A_2 e A_3 mostraram linhas com g de 2,45 e as amostras A_2 e A_3 em g = 2,38. Os espectros evidenciaram também a presença de porfirinas de Cu^{2+} na região do espectro perpendicular ($A_n = 16.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) [72].

FIGURA 17 - ESPECTROS NORMALIZADOS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DE AH EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.



Nos espectros normalizados de FTIR dos ácidos húmicos (Figura 18), todas as amostras apresentaram uma banda larga, de grande intensidade em 3400 cm^{-1} (estiramento O-H de grupos fenólicos e carboxílicos). Bandas a 2920 e a 2845 cm^{-1} (deformação axial de CH alifático) [64], variaram de intensidade e bandas de absorção em 1650 e 1450 cm^{-1} (carboxilatos) aumentaram de intensidade durante a compostagem. Ombros de absorção a 1710 e 1215 cm^{-1} , sugerem a presença de grupos carboxílicos. Os dados sugerem um aumento nas concentrações dos grupos carboxílicos (regiões 2900 e 1700 cm^{-1} , respectivamente) entre as amostras inicial e final, o que concorda com os resultados de ^{13}C .

FIGURA 18 - ESPECTROS NORMALIZADOS DE INFRAVERMELHO DE ÁCIDOS HÚMICOS, EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.



Os espectros de RMN de ^{13}C CPMAS das amostras de AH em estado sólido (ver ANEXO I) mostraram variação nas intensidades relativas (IR) dos picos ao longo do tempo de compostagem (Tabela 4). Todas as amostras exibiram picos em 56, 72, 129, 147 e 174 ppm (Figura 19). Na região de C carbonílico (200-160 ppm) destacam-se dois picos distintos a 190 e 170 ppm. O pico em 170 ppm é atribuído a C carboxílico, de amida ou de éster [75] e o aumento na sua IR é explicado pela formação de ácidos carboxílicos durante a degradação da lignina e ao C de amidas oriundos de material protéico [76]. O sinal em 190 ppm é atribuído a carbonila de aldeído e seu desaparecimento no espectro CPMAS-DD corrobora esta atribuição. A IR do sinal nesta região (200 a 160 ppm) aumentou durante a compostagem, indicando a formação de estruturas mais oxidadas durante a humificação. Em todas as amostras predominam os sinais na região de C aromático (160 a 100 ppm), sem grandes variações nas IR totais. Através do espectro CPMAS-DD pode-se observar, no

entanto, que a IR dos C-H aromáticos diminuiu enquanto que a IR dos C substituídos (quaternários) aumentou ao longo da compostagem. Os picos na região entre 100 e 50 ppm são típicos de C ligado a heteroátomo, sendo que a região entre 100 e 70 ppm é atribuída a C anomérico de carboidratos enquanto que a região entre 70 e 50 ppm é atribuída a grupos metoxilas de ligninas, sendo ambos típicos de substâncias húmicas. Na região de C alifático, houve diminuição das IR ao longo da compostagem.

A RMN de ^{13}C CPMAS-DD permitiu verificar que, embora o grau de aromaticidade das amostras de composto não tenha sofrido grande variação, houve um aumento dos C aromáticos substituídos ao longo da compostagem, devido provavelmente ao aumento de estruturas fenólicas resultantes de processos oxidativos.

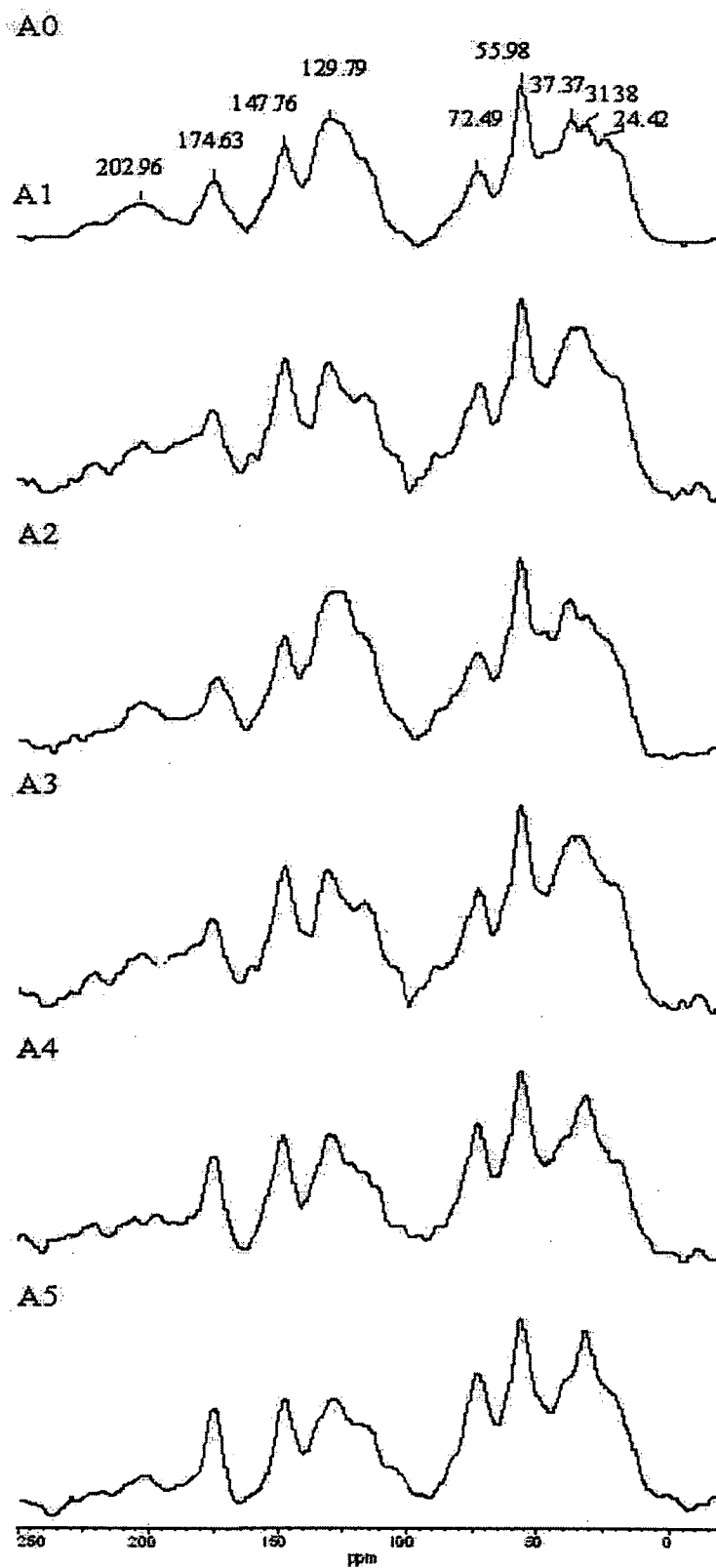
TABELA 4 - INTENSIDADES RELATIVAS (%) DOS GRUPOS FUNCIONAIS DE AH DE COMPOSTO AO LONGO DA COMPOSTAGEM.

AMOSTRAS	Intensidades Relativas (%)						
	Regiões (ppm)						
	Carbonos carbonílicos (200-160)	Carbonos aromáticos (160-100)			Carbonos heteroatomos (carboidratos) (100-70)	Carbonos heteroatomos (metoxílicos) (70-40)	Carbonos alifáticos (40-0)
		não substituídos	quaternários *	Totais			
A0	11,2	31,4	13,6	45,0	3,8	13,0	26,9
A1	11,9	28,1	16,6	44,7	4,5	12,6	26,3
A2	12,0	29,9	13,5	43,4	6,2	13,6	24,6
A3	12,9	24,3	20,0	44,3	1,4	10,7	30,6
A4	13,2	24,2	21,7	45,9	1,5	14,7	24,5
A5	16,7	27,8	15,9	43,7	3,0	12,7	23,8

* obtidos do espectro de ^{13}C CPMAS-DD

Os resultados de análise elementar de CHNS das amostras de AH (Tabela 5) mostraram a perda de aproximadamente 6% do carbono da massa seca do material de partida. Esta perda pode ser explicada pela liberação de CO_2 , principalmente na fase termófila da compostagem. A porcentagem de O, calculada por diferença, aumentou em ao longo do processo. A redução dos teores de H e N sugerem um aumento na condensação das estruturas orgânicas e perda de N por volatilização de amônia.

FIGURA 19 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{13}C NO ESTADO SÓLIDO (CPMAS) DE AH A DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.



As razões H/C e N/C dos AH se mantiveram estáveis ao longo do processo, porém a razão O/C aumentou em cerca de 0,2 pontos indicando um aumento no grau de oxidação destas amostras. As razões O/C, N/C e H/C das amostras de composto foram mais estáveis do que as dos AH, possivelmente pela variação das substâncias não húmicas nestas amostras, tais como açúcares, aminoácidos, proteínas. O teor relativamente alto de S em todas as amostras, em comparação a outros resíduos orgânicos, pode ser explicado pela presença do lodo biológico de fábrica de celulose Kraft, que utiliza Na_2SO_4 no processo industrial.

TABELA 5 - ANÁLISE ELEMENTAR DAS AMOSTRAS DE AH DURANTE A COMPOSTAGEM.

Amostra	C	H	N	S	O	H/C	N/C	O/C
%								
<i>Ácido húmico</i>								
A0	50,98	5,84	4,01	6,70	32,47	1,37	0,07	0,48
A1	46,46	5,39	3,81	7,28	37,06	1,39	0,07	0,60
A2	46,40	5,19	3,71	6,74	37,96	1,34	0,07	0,61
A3	45,20	5,08	3,81	6,83	39,08	1,35	0,07	0,65
A4	44,68	5,21	3,84	7,04	39,23	1,40	0,07	0,66
A5	44,87	5,40	4,05	7,03	38,65	1,44	0,08	0,65
Serragem	50,04	5,38	1,48	5,47	37,63	1,29	0,03	0,56
Lodo	43,44	5,11	3,80	8,31	39,34	1,41	0,07	0,68
<i>Composto</i>								
A0	44,81	5,88	1,84	7,84	39,63	1,57	0,04	0,66
A1	45,28	5,76	1,53	6,38	41,05	1,53	0,03	0,68
A2	47,12	5,98	1,30	6,66	38,94	1,52	0,02	0,62
A3	45,76	5,82	1,55	5,94	40,93	1,53	0,03	0,67
A4	42,70	5,43	1,61	5,66	44,60	1,53	0,03	0,78
A5	44,27	5,53	1,71	5,87	42,62	1,50	0,03	0,72
Serragem	45,97	5,93	0,64	-	47,46	1,55	0,01	0,77
Lodo	29,54	4,27	2,86	7,33	56,00	1,73	0,08	1,42

NOTA: Análise realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

As baixas razões E_4/E_6 estão diretamente relacionadas com o aumento da conjugação de ligações químicas simples e duplas, que nos AH de solos, ou sedimentos mais antigos, correspondem à condensação de grupos aromáticos. Nos AH novos aqui estudados, no entanto, podem representar também ligações químicas conjugadas em

estruturas de grupos alifáticos insaturados. Estudos mostraram que este dado independe da concentração de material húmico, mas varia para materiais obtidos de diferentes tipos de solos e sedimentos [73]. A diminuição da razão E_4/E_6 , com o tempo de compostagem, sugere também, interações de blocos moleculares menores via quelação de íons metálicos do tipo ácidos duros, como Fe^{3+} , por exemplo, por grupos catecolatos oriundos da desmetilação de grupos metoxilas de estruturas do tipo siringila ou guaiacila [77].

TABELA 6 - RAZÃO E_4/E_6 (RAZÃO ENTRE AS ABSORBÂNCIAS A 465 E 665 NM) DAS AMOSTRAS DE AH AO LONGO DA COMPOSTAGEM.

Amostras*	E_4/E_6
A0	6.21
A1	6.09
A2	5.86
A3	5.00
A4	6.25
A5	5.53

O processo de compostagem sob aeração forçada, como aquele aqui estudado, teria sua eficiência explicada (entre outros fatores), por sua alta capacidade de oxidação das estruturas químicas do material original. Os resultados espectroscópicos e de análise elementar evidenciam a natureza mais oxidada do composto em relação ao material de partida. No entanto, deve-se considerar que os ácidos húmicos formados neste processo encontram-se ainda em fase jovem e diferem, portanto de AH de solos mais antigos e humificados.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DO COMPOSTO PELO MÉTODO PIROFOSFATO/NaOH

5.3.1. RENDIMENTO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DO COMPOSTO

O composto de serragem-lodo apresentou rendimentos percentuais variando de 5,26% a 6,95% (Tabela 7), com valor médio de 6,36% para ácidos húmicos, 0,26% a 0,88% com valor médio de 0,44% para ácidos fúlvicos e 0,03% a 1,03% com valor médio de 0,24% para humina. Quanto aos materiais de partida, verificou-se que o lodo contribuiu especialmente no teor de ácidos húmicos. O baixo teor de humina em todas as amostras evidencia a natureza essencialmente orgânica do material compostado e o baixo teor de material orgânico insolúvel em álcali e de material mineral contido nas amostras.

TABELA 7 - RENDIMENTOS PERCENTUAIS DAS FRAÇÕES HÚMICAS EM COMPOSTO LODO-SERRAGEM EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.

Amostra	AH %	AF%	HU%	TOTAL
A ₀	6,88	0,36	0,04	7,28
A ₁	5,26	0,40	0,13	5,78
A ₂	5,53	0,30	0,03	5,87
A ₃	6,64	0,26	0,14	7,04
A ₄	6,90	0,47	0,08	7,45
A ₅	6,95	0,88	1,03	8,85
Lodo	17,06	0,33	0,54	17,94
Serragem	1,52	1,58	0,76	3,85

5.3.2. ANÁLISE ELEMENTAR DAS FRAÇÕES HÚMICAS

Todas as frações foram analisadas em Analisador Fyson quanto aos teores de C, H e N. Os teores de O+S foram obtidos por diferença. Os resultados são compatíveis com teores de CHN citados na literatura (Tabela 8). Embora o teor de enxofre esteja presente nas amostras de composto em torno de 7%, para o cálculo da razão O/C considerou-se somente o peso atômico do oxigênio.

TABELA 8 - TEORES DE C, H, N E O+S (%) DAS FRAÇÕES HÚMICAS DE COMPOSTO SERRAGEM – LODO, EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.

Amostra	ÁCIDO HÚMICO				ÁCIDO FÚLVICO				HUMINA			
	C	H	N	O+S	C	H	N	O+S	C	H	N	O+S
A0	58,20	7,00	3,44	31,36	27,35	2,73	4,04	65,88	50,60	6,34	2,69	40,37
A1	58,55	6,79	3,41	31,26	31,00	4,00	3,09	61,91	44,70	5,66	2,41	47,23
A2	58,10	6,73	3,42	31,75	31,10	4,60	3,66	60,64	43,10	5,42	2,61	48,87
A3	57,50	7,37	3,24	31,89	32,60	4,34	3,72	59,34	35,90	3,74	1,82	58,54
A4	56,20	6,41	3,45	33,94	29,55	3,22	3,43	63,81	51,70	6,42	2,45	39,43
A5	57,10	7,00	3,62	32,28	28,30	4,45	2,95	64,30	32,10	3,54	1,72	62,64
Lodo	57,40	7,81	2,93	31,86	40,50	5,10	6,51	47,89	29,00	3,87	1,67	65,46
Serragem	55,60	6,05	1,13	37,22	51,10	5,15	7,21	36,54	47,60	6,06	1,72	44,62

A razão N/C tem sido usada para identificar a fonte da matéria orgânica. Razões N/C mais elevadas apontam para MO original mais alifática e protéica. Baixa razão N/C sugere MO original oriunda de vegetais superiores (material com maiores teores de lignina). Razões H/C altas indicam estruturas mais alifáticas, e razões H/C baixas indicam estruturas mais aromáticas [73].

A fração AF é o material mais rico em grupos nitrogenados, pois esta fração apresenta a mais alta razão N/C (Tabela 9). A razão H/C aponta porém, para um material mais aromático ou condensado e menos alifático, o que é confirmado por dados de infravermelho, como será discutido a seguir. Em se tratando de AF extraídos de material recém humificado, o mais provável é se tratar de material mais substituído e funcionalizado, como aponta ainda a razão O/C expressivamente maior. A fração AH parece ser a menos funcionalizada (ou oxidada), como sugere as menores razões O/C.

TABELA 9 - RAZÕES ATÔMICAS H/C, N/C E O/C DAS FRAÇÕES HÚMICAS DE COMPOSTO SERRAGEM – LODO, AO LONGO DA COMPOSTAGEM.

	ÁCIDO HÚMICO			ÁCIDO FÚLVICO			HUMINA		
	H/C	N/C	O/C	H/C	N/C	O/C	H/C	N/C	O/C
A0	1,44	0,05	0,40	1,20	0,13	1,81	1,50	0,05	0,60
A1	1,39	0,05	0,40	1,55	0,09	1,50	1,52	0,05	0,79
A2	1,39	0,05	0,41	1,77	0,10	1,46	1,51	0,05	0,85
A3	1,54	0,05	0,42	1,60	0,10	1,37	1,25	0,04	1,22
A4	1,37	0,05	0,45	1,31	0,10	1,62	1,49	0,04	0,57
A5	1,47	0,05	0,42	1,89	0,09	1,70	1,32	0,05	1,46
Lodo	1,63	0,04	0,42	1,51	0,14	0,89	1,60	0,05	1,69
Serragem	1,31	0,02	0,50	1,92	0,12	0,54	1,53	0,03	0,70

5.3.3. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA (DRIFT) DAS FRAÇÕES ÁCIDO HÚMICO, ÁCIDO FÚLVICO E HUMINA

As principais bandas de absorção dos espectros de Infravermelho das amostras AF, AH e HU (Figura 20, Figura 21 e Figura 22 respectivamente e ANEXO II, espectros expandidos), são características de SH, como já mostrados em literatura [14].

O espectros de todas as amostras mostraram na região de 3300 cm^{-1} , uma banda larga devida ao estiramento de grupos hidroxilícos com ligações de hidrogênio de álcoois ou ácidos carboxílicos. Destaca-se a banda em torno de 3050 cm^{-1} atribuída ao estiramento de $-\text{CH}$ aromático [78]. Esta banda geralmente é de baixa intensidade e dificilmente é aparente nos espectros de IVTF sem o DRIFT. As bandas entre 2950 e 2850 cm^{-1} são atribuídos às vibrações simétrica e assimétrica de $-\text{CH}$ alifático, e são bem definidas nos espectros dos AH e HU, porém mais fracas nos espectros dos AF. A região de 1700 cm^{-1} apresenta banda mal definida nos espectros de AH e HU e parece ausente nos espectros de AF. Esta banda é atribuída a carboxilas e sua ausência poderia ser explicada pelo efeito que a resina XAD-8 causa à esta fração. Esta resina apresenta grupos polares em sua matriz capaz de complexar os metais aos grupos carboxílicos, tornando predominante a forma carboxilato [79].

A forte banda em torno de 1660 cm^{-1} pode ser atribuída a movimento assimétrico de grupos $-\text{COO}^-$ e de $-\text{C}=\text{C}$ aromático, olefínico ou ainda de grupo amida. A banda em 1665 cm^{-1} pode ser devida a presença de ácidos carboxílicos com ligações de hidrogênio interna. Ácidos *orto*-hidroxibenzóicos podem quelar de um modo semelhante à *orto*-hidroxiacetofenonas e *orto*-hidroxibenzaldeídos com um correspondente deslocamento da frequência da carbonila. O ácido salicílico, um conhecido modelo de SH, absorve a 1655 cm^{-1} . A banda fraca em torno de 1590 cm^{-1} , um pouco mais intensa nos AH, pode ser atribuída à vibração de estiramento $-\text{C}-\text{C}$ de anel aromático. 1597 cm^{-1} é a absorção típica de benzeno monosubstituído. A região entre 1450 e 1400 cm^{-1} corresponde a movimento $\delta(-\text{CH}_2)$ de grupos alifáticos e novamente estão melhor delineadas nos espectros dos AH e das HU. As bandas entre 1260 e 1220 cm^{-1} podem ser devidas a $\delta(-\text{CH})$ vizinhos a grupos

alcoólicos e $\nu(-C-O)$ de fenóis. Bandas entre 1100 e 1000 cm^{-1} são devidas principalmente ao estiramento $-C-O$ e são características de carboidratos [78].

As bandas em torno de 950 cm^{-1} também estão associadas a polissacarídeos [80, 81] e estão presentes nos espectros de AF e AH, e ausentes nos de HU. Esta região também pode ser devida a grupos ácidos, éteres ou álcoois, quando associadas às da região entre 1600 e 1400 cm^{-1} . As bandas na região de baixa absorção em torno de 720 e 530 cm^{-1} estão associadas a componentes inorgânicos, tais como argilas e quartzos [81] e estão presentes em menor intensidade nos espectros de AF e de HU, porém são praticamente ausentes nos espectros de AH.

Os resultados da espectroscopia de infravermelho revelaram que o composto é um material rico em hidroxilas, em grupos alifáticos, em fenóis parcialmente substituídos, em grupos carboxilatos e em carboidratos e concorda com resultados anteriores obtidos por espectroscopia de IVTF. Os espectros com refletância difusa (DRIFT), porém, além da melhor resolução, foram capazes de revelar bandas como as de $-C-H$ de aromáticos, confirmando a natureza lignínica do material.

FIGURA 20 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (DRIFT) DE ÁCIDO FÚLVICO (AF) DE COMPOSTO EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.

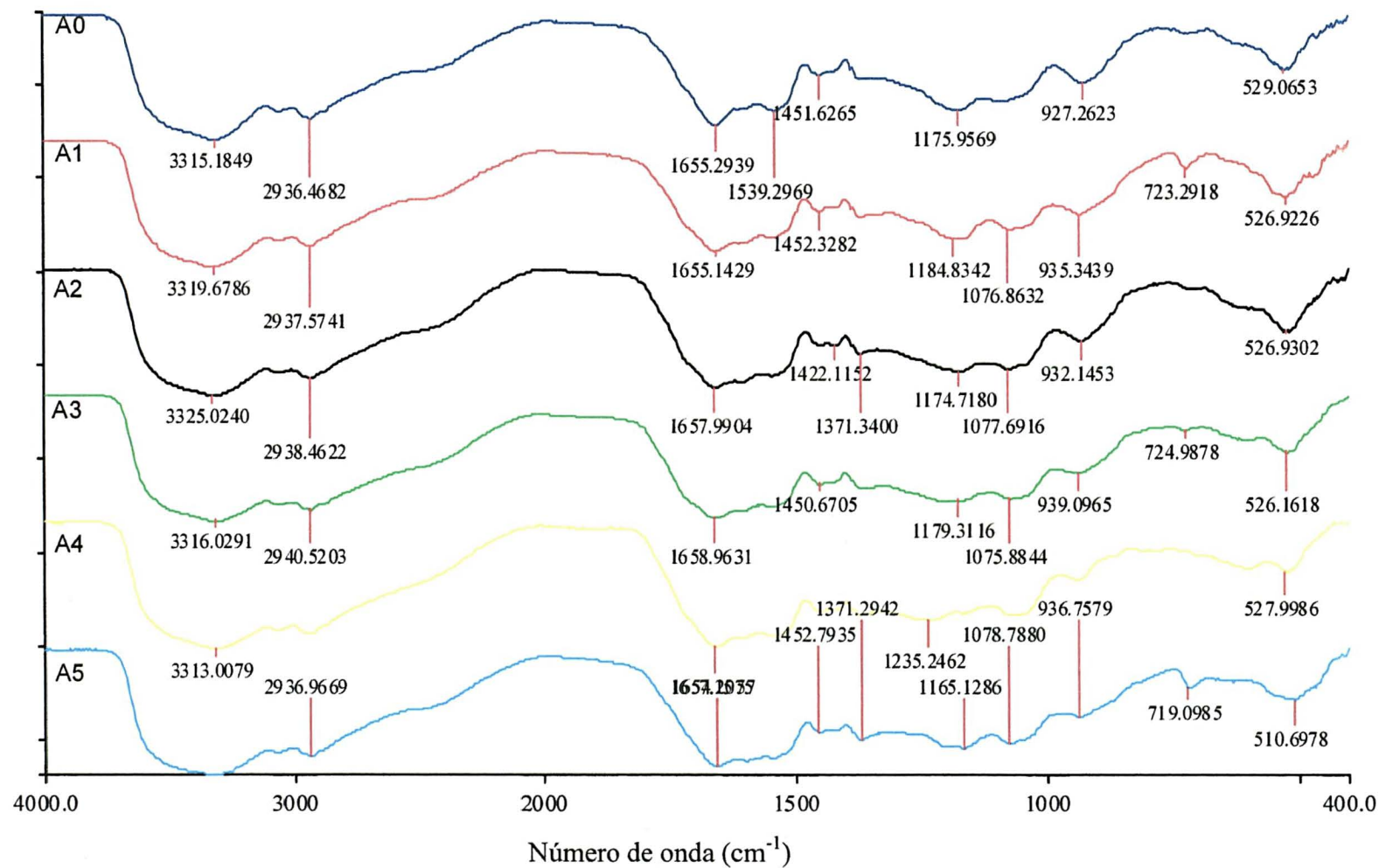


FIGURA 21 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (DRIFT) DE ÁCIDO HÚMICO (AH) DE COMPOSTO EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.

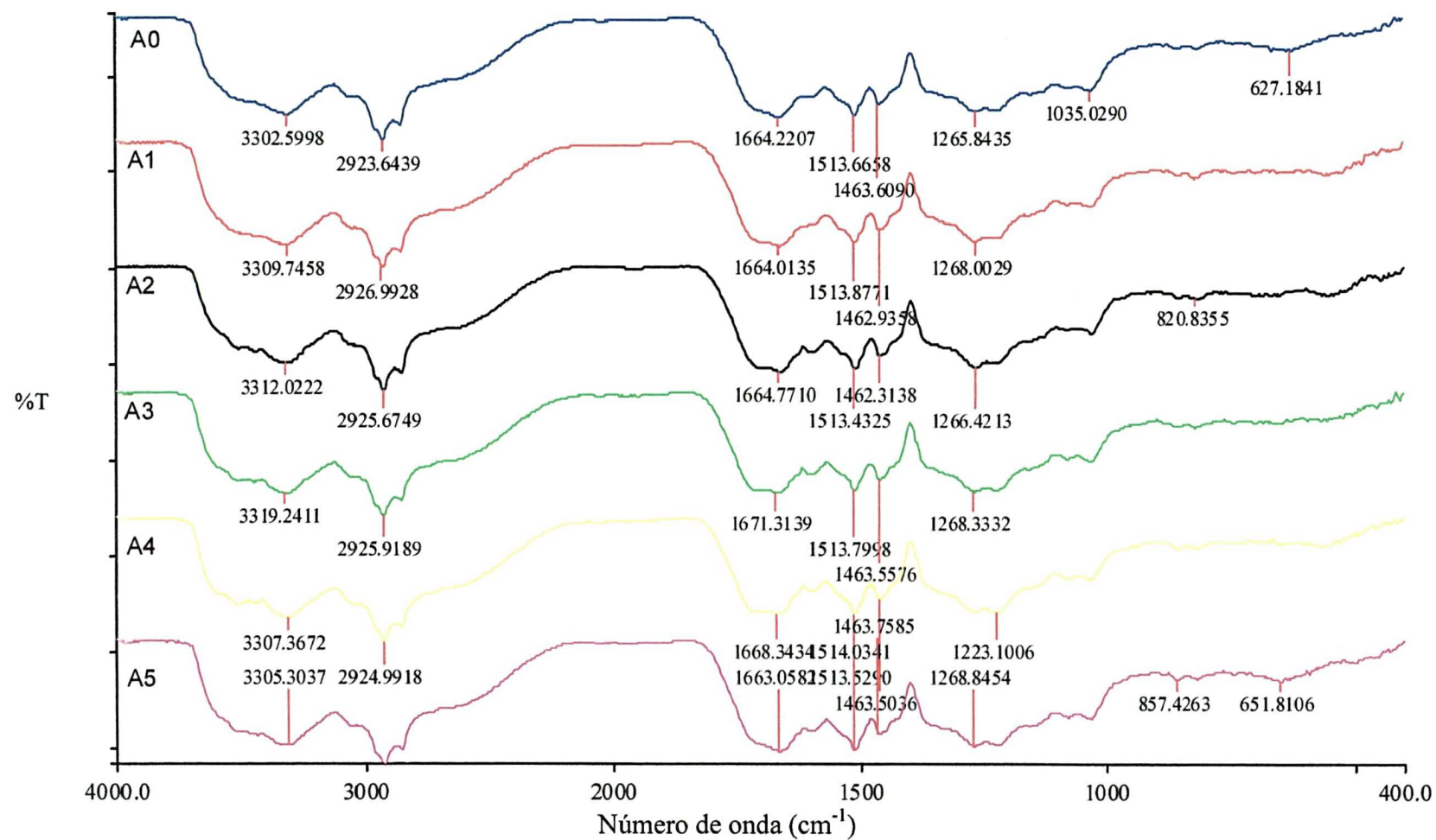
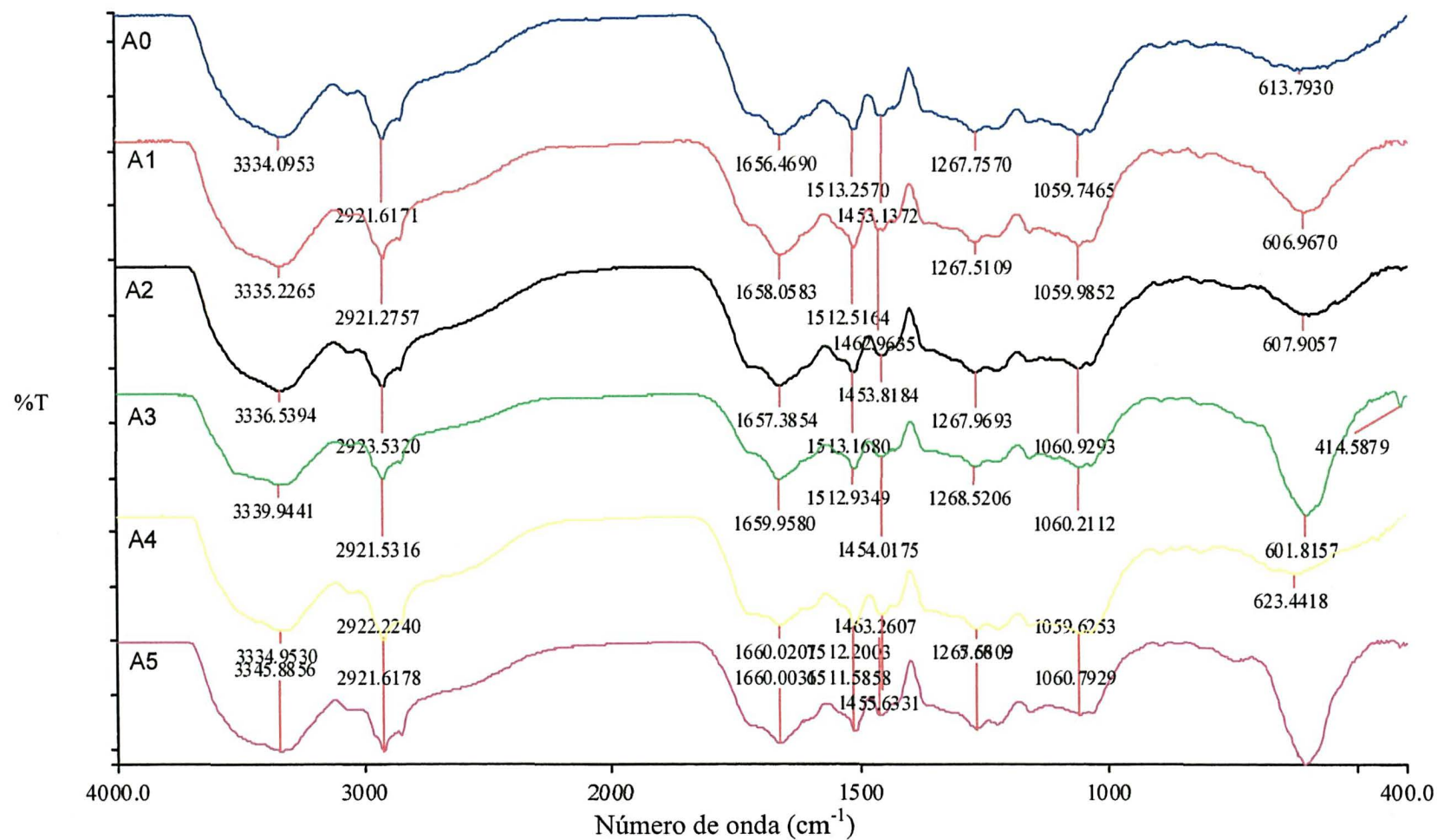


FIGURA 22 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (DRIFT) DE HUMINA (HU) DE COMPOSTO EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.



5.3.4. ANÁLISE POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DAS FRAÇÕES ÁCIDO HÚMICO, ÁCIDO FÚLVICO E HUMINA

Os espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) das amostras de AF, AH e HU apresentaram sinais típicos de radicais livres orgânicos com valores em torno de $g = 2,0037$ para AH, $2,0044$ para AF e $2,0034$ para HU (Tabela 10), característicos de estruturas de semiquinonas [40,64].

TABELA 10 - PARÂMETROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DAS FRAÇÕES HÚMICAS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.

Amostra	AH			AF			HU		
	Fator g	Lw *	RLO **	Fator g	Lw *	RLO **	Fator g	Lw *	RLO **
A ₀	2,0037	5,6	1,91	2,0044	7,1	1,63	2,0033	4,1	21,2
A ₁	2,0037	5,2	2,54	2,0044	6,9	1,59	2,0034	4,2	16,8
A ₂	2,0037	5,2	2,11	2,0044	7,0	2,46	2,0035	4,3	10,5
A ₃	2,0038	5,2	2,14	2,0045	6,9	2,44	2,0034	4,3	18,0
A ₄	2,0037	5,3	3,00	2,0044	6,9	1,88	2,0033	4,2	19,4
A ₅	2,0038	5,6	2,01	2,0045	6,7	1,85	2,0034	4,3	10,7
Lodo	2,0039	6,3	2,72	2,0046	8,0	4,41	2,0038	5,0	6,15

* Lw = largura de linha em Gauss

** RLO = radical livre orgânico em $\text{spin g}^{-1} \times 10^{16}$

A presença de semiquinonas indica a existência de *orto*- e *para*- bifenóis nas estruturas orgânicas. *Orto* – bifenol é um bom grupo quelante de íons metálicos e também um bom indicador do grau de humificação [64]. Em média, os valores de g foram um pouco mais altos nas amostras de AF e um pouco mais baixos para as amostras de HU. O valor de g em espécies ricas em grupos oxigenados é geralmente mais alto [82], como no caso dos AF. Além disso, os AF usualmente apresentam larguras de linha ligeiramente maiores do que AH isolados da mesma fonte, o que é confirmado pelos resultados obtidos neste trabalho. As pequenas variações na largura de linha refletem os diferentes números de ressonâncias sobrepostas a valores de campo levemente diferentes, cuja soma total contribui para o sinal. O alargamento da largura de linha pode assim refletir o deslocamento parcial

do elétron desemparelhado da semiquinona para dentro de uma rede aromática conjugada. A largura de linha aumenta também, devido às interações superhiperfinas não resolvidas do elétron livre com os núcleos de ligantes vizinhos [40]. A AF, em se tratando da fração com maior concentração de grupos funcionais oxigenados, reuniria um maior número de possibilidades de interações superhiperfinas e maior possibilidade de deslocalização do elétron por conjugação em sistemas aromáticos substituídos.

Ao longo da compostagem, os valores de g e a largura de linha não variam significativamente. O número de spin por grama de amostra, no entanto, varia expressivamente ao longo do processo e entre as diferentes frações (Figura 23).

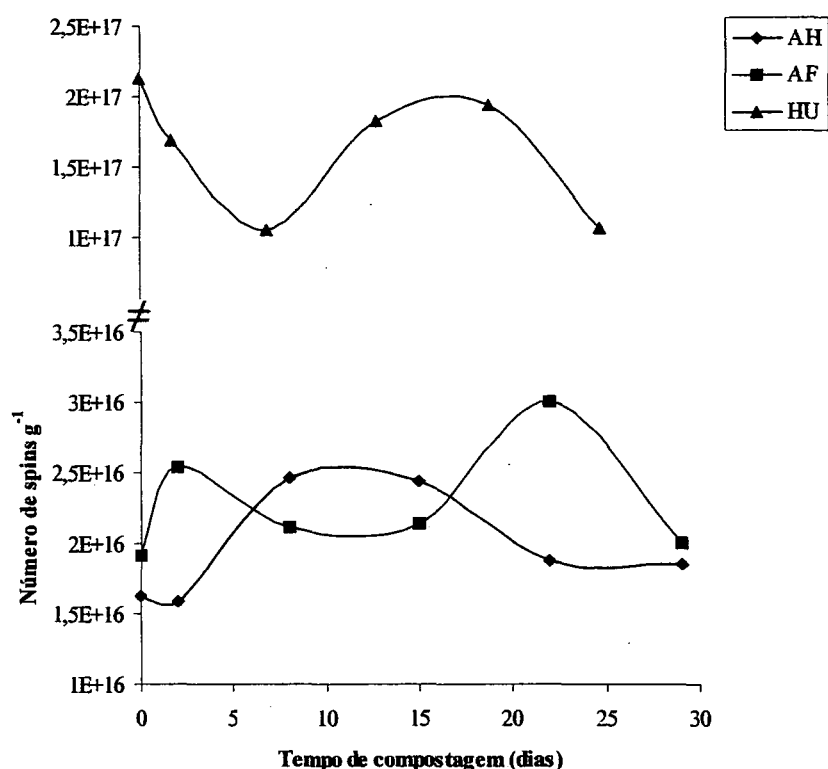


FIGURA 23 - TEOR DE RADICAIS LIVRES ORGÂNICOS NAS FRAÇÕES HÚMICAS AH, AF E HU EXTRAÍDAS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM A DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.

Os teores de RLO nas frações AH e AF variam de maneira quase inversa e sincronizada, sendo que até o segundo dia de compostagem, este parâmetro cresce na fração AF e diminui nos AH. A partir daí a situação se inverte, sendo que entre o oitavo e o décimo quinto dia, mantém-se relativamente estável, com o teor de spins nos AH maior do que nos AF. A partir daí ocorre nova inversão, com o aumento mais acentuado nos AF do que a correspondente diminuição nos AH. Na fração HU, o teor de spins apresenta um comportamento senoidal, com o mínimo em torno do oitavo dia e o máximo entre o décimo quinto e o vigésimo segundo dia de compostagem.

É interessante destacar que, durante os primeiros 20 dias do processo, a temperatura manteve-se acima de 50° C [77], indicando a ação de microrganismos termófilos, fase inicial da compostagem, onde a decomposição e consumo de carbono ocorrem. Nesta fase ocorrem principalmente processos de descarboxilação e desmetoxilação por acoplamento oxidativo próprios da respiração microbiana, catalisados por enzimas, com perda de carbono. A descarboxilação e a desmetoxilação via radicalar, com conseqüente liberação de CO₂ e metanol respectivamente, podem ser explicadas baseado em um mesmo mecanismo, como proposto por Dec e colaboradores [20]. De acordo com este mecanismo, existem três possibilidades: 1) o radical livre pode acoplar sem a liberação do substituinte; 2) o acoplamento pode resultar na liberação de um substituinte; e 3) dois substituintes podem ser liberados em um único acoplamento (Figura 24). A desmetoxilação, no entanto, seria menos favorecida e menos intensa, pois por ser um grupo doador de elétrons, a metoxila em posição *orto* ou *para* desestabilizaria o carbono radicalar das estruturas de ressonância. Resultados experimentais indicam ainda que não ocorre evolução de metano nestes processos e, portanto a desmetilação.

Na fase termófila, são consumidos os componentes químicos do substrato de fácil assimilação metabólica, tais como açúcares e aminoácidos, entre outros [5]. Sendo a fração AF a mais solúvel, é de se esperar que nela se concentrem exatamente estes componentes e, portanto seu consumo poderia explicar a diminuição no número de spins até o final desta fase da compostagem, o que pode ser confirmado pelos dados de rendimento percentual anteriormente citados (Tabela 8). A partir daí, quando se inicia a humificação propriamente dita, a quebra dos componentes mais resistentes como ligninas, por exemplo, poderia

explicar tanto o aumento do número de spins como o aumento da quantidade relativa da fração AF. De fato, o aumento de unidades monoméricas de ligninas durante a compostagem de lodo-serragem, já havia sido constatado por Marche e colaboradores [83].

O aumento do número de spins na fração AH no início da compostagem, pode ser explicado pela quebra de estruturas poliméricas de ligninas, gerando carboxilas terminais.

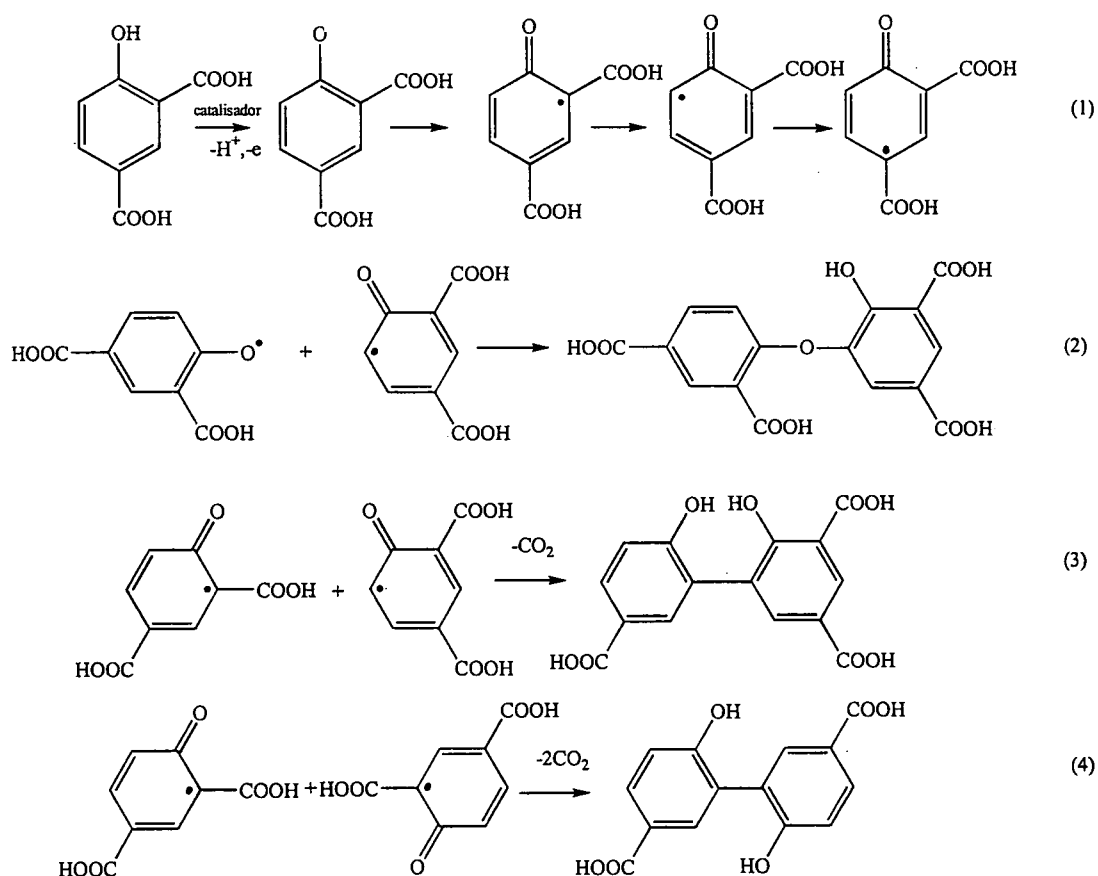


FIGURA 24 - POSSÍVEIS REAÇÕES DE ACOPLAMENTO ENTRE RADICAIS LIVRES GERADOS DURANTE A TRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO 4-HIDROXI-1,3-DIBENZÓICO MEDIADA POR FENOLOXIDASES [20].

Os espectros de EPR das frações AF e AH em campo magnético de 5000 G, à temperatura ambiente e a 77 K, (Figuras 25 e 26), mostraram sinais de Fe^{3+} em alto spin ($S=5/2$), complexado em estruturas octaédricas distorcidas e/ou tetraédricas, em coordenação de simetria rômica (linha assimétrica em $g = 4,3$). Na HU (Figura 27), porém, este sinal é quase ausente indicando menor concentração de Fe^{3+} nesta fração. Esta forma de ferro exibe razoável resistência à troca por próton ou outro metal e à redução, sugerindo que estes íons estão fortemente ligados e protegidos pela estrutura das SH em complexos esfera interna [40].

FIGURA 25 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DA FRAÇÃO ÁCIDO FÚLVICO (AMOSTRA SÓLIDA) EM 5000 G, (A) À TEMPERATURA AMBIENTE E (B) À 77° K.

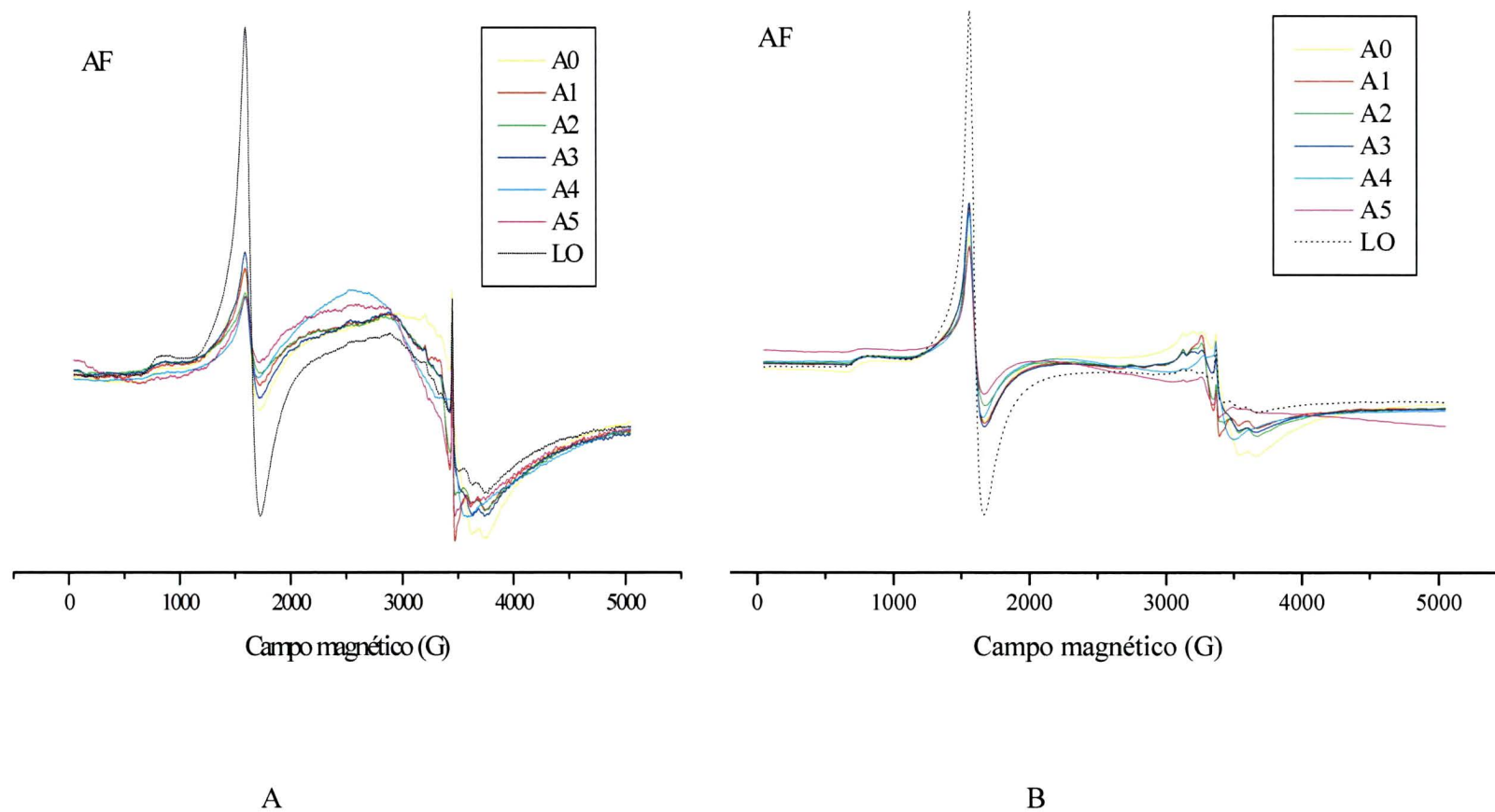


FIGURA 26 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DA FRAÇÃO ÁCIDO HÚMICO (AMOSTRA SÓLIDA) EM 5000 G, (A) À TEMPERATURA AMBIENTE E (B) À 77° K.

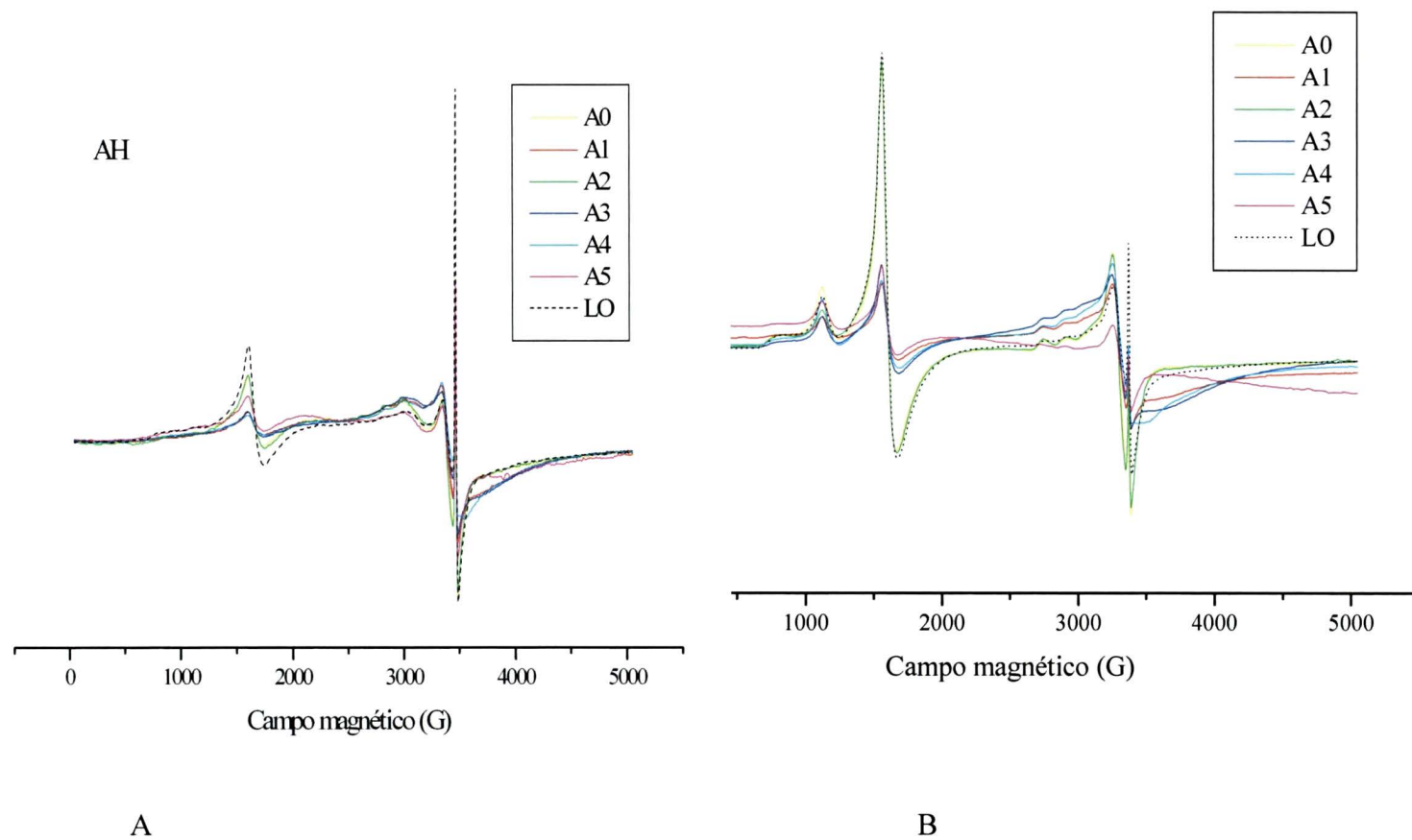
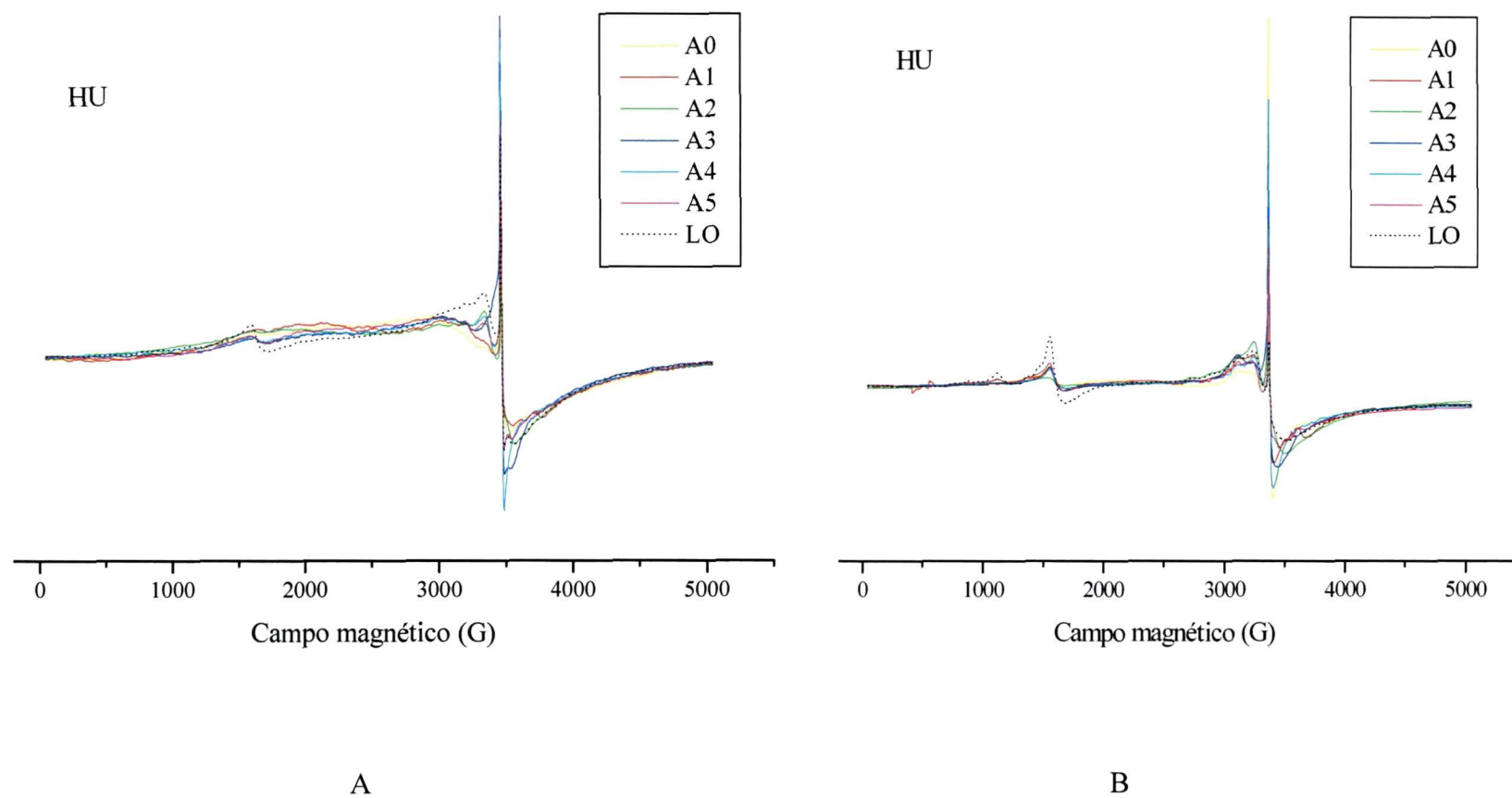


FIGURA 27 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DA FRAÇÃO HUMINA (AMOSTRA SÓLIDA) EM 5000 G, (A) À TEMPERATURA AMBIENTE E (B) À 77° K.



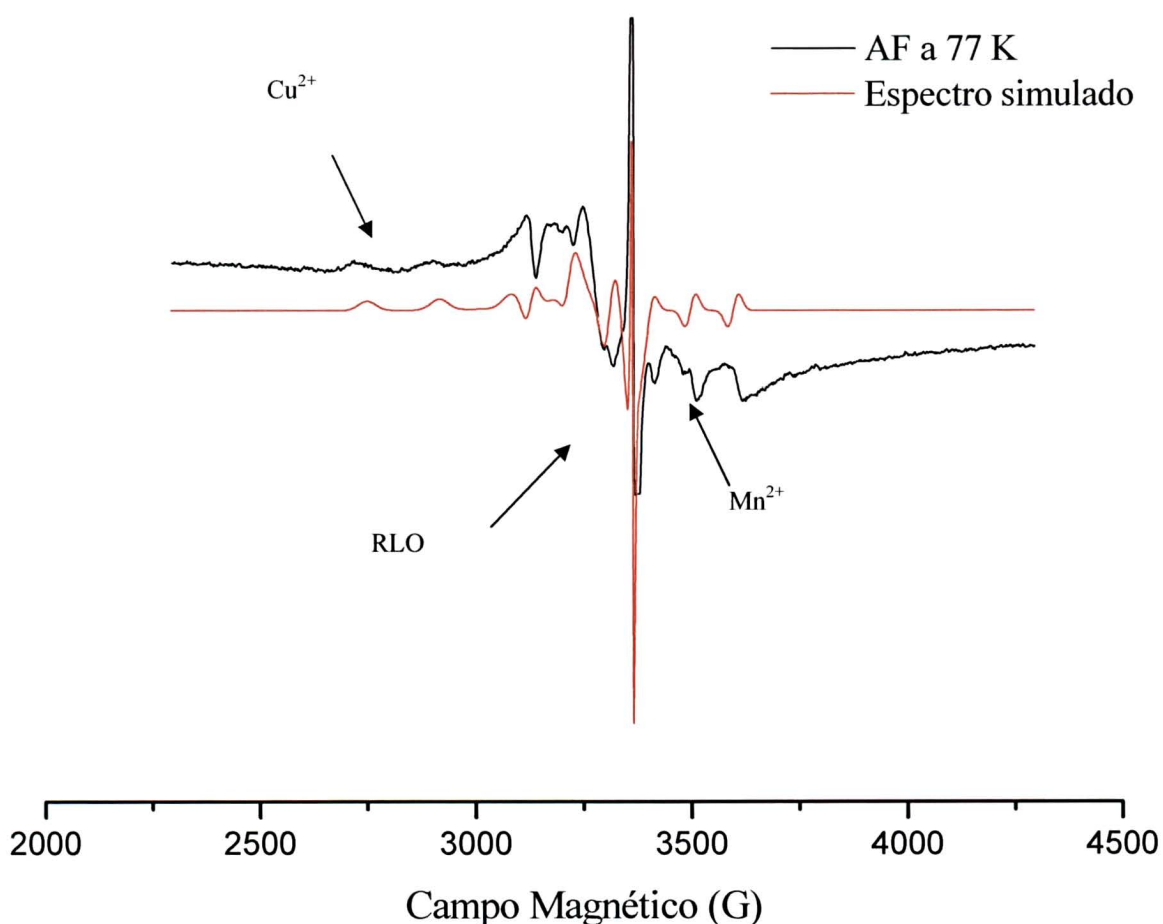
A linha larga centrada em $g = 2$ é explicada pela superposição de várias linhas originárias do acoplamento spin-spin estendido entre vários íons metálicos paramagnéticos que absorvem nesta região. A maioria destas linhas pode ser oriunda do acoplamento de spin de íons Fe^{3+} em alto spin, fracamente ligadas às estruturas húmicas em sítios octaédricos com pequena distorção axial de simetria cúbica [40,68]. Esta região é conhecida como a dos domínios concentrados de Fe^{3+} .

Nos espectros obtidos a 77 K desta fração, o sinal em $g = 4,3$ é intensificado e mostra a diminuição da intensidade da linha larga, devida aos domínios concentrados de íons Fe^{3+} , (g em torno de 2). Na fração AH e, em menor intensidade, na fração HU, o espectro a 77 K mostra ainda sinal em torno de $g = 6,0$ e $g = 9,0$. O sinal em $g = 9,0$ geralmente é atribuído a íons Fe^{3+} em sítios com simetria aproximadamente ortorrômbica, atribuído aos íons em domínios diluídos, onde a vizinhança entre 2 núcleos de ferro é mais afastada, e o sinal em 6 corresponde ao valor de g_{\perp} atribuído a íons Fe^{3+} em alto spin em campos cristalinos fortemente axiais, sugerindo que os íons Fe^{3+} responsáveis por este sinal possam estar ligados a quatro átomos de nitrogênio em configuração planar, possivelmente de estruturas residuais derivadas de clorofilas, onde o magnésio foi substituído pelo ferro [40,64], o que sugere a presença de estruturas de porfirinas de ferro na amostra.

Todos os espectros a 77 K evidenciam também um complexo padrão de absorção em torno de $g = 2$, onde destaca-se um quadrupletto de interação hiperfina a $g// = 2,25$ e $A = 175$ G, típicos de complexo de cobre em esfera interna, com ligantes arranjados em coordenação planar (octaedro distorcido) em torno do íon central Cu^{2+} ($I = 3/2$) [40,84]. Um padrão de 6 linhas, superposto a esta região, indica também a presença de complexo de manganês. Os parâmetros de RPE ($A = 88$ G e $g = 2,005$) são consistentes com complexos de esfera externa de íons Mn^{2+} ($I = 5/2$), os quais retêm suas camadas de hidratação em esfera interna e estão ligados, principalmente por forças eletrostáticas, a seis átomos de oxigênio de grupos carboxilatos e/ou fenolatos carregados negativamente, em ambiente octaédrico distorcido [40]. A Figura 27 mostra os espectros de AF da amostra A_2 , obtidos a 77 K e um espectro simulado com um núcleo de Cu^{2+} , um núcleo de Mn^{2+} e sinal de radical livre orgânico, o qual confirma as atribuições descritas acima.

Os resultados de RPE mostraram que a fração húmica apresentou as maiores concentrações de radicais livres orgânicos em todas as amostras ao longo da compostagem. Esta fração apresentou também as menores intensidades de sinal de Fe^{3+} . A maior variação ao longo da compostagem na intensidade do sinal referente a este íon, na região dos domínios diluídos, foi verificada na fração ácido húmico.

FIGURA 28 - ESPECTRO EXPERIMENTAL DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DE AMOSTRA DE ÁCIDO FÚLVICO OBTIDO À 77 K E ESPECTRO SIMULADO COM UM NÚCLEO DE COBRE, UM NÚCLEO DE MANGANÊS E COM SINAL DE RADICAL LIVRE ORGÂNICO (RLO).

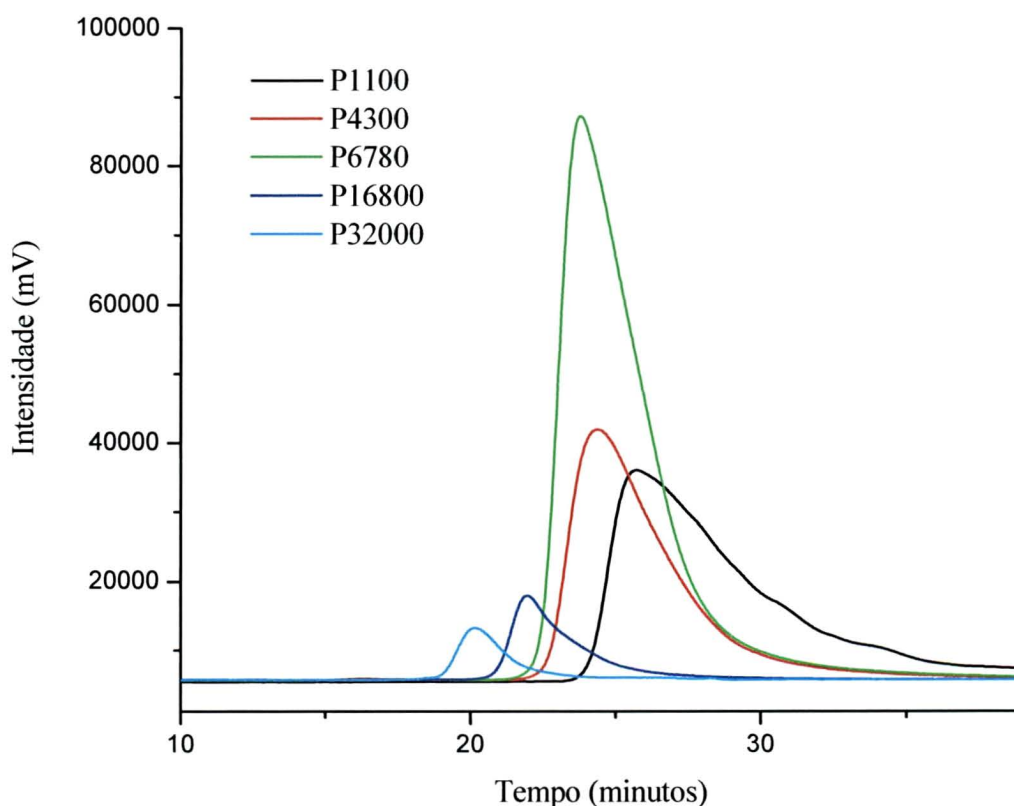


5.3.5. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A curva de calibração foi obtida a partir dos volumes de retenção dos padrões poliestirenosulfonatos (PSS) de diferentes tamanhos moleculares (Figura 29).

O desvio padrão relativo dos valores máximos das massas molares médias (M_w) obtidos nas replicatas nunca ultrapassou 0,23%, confirmando a grande reprodutibilidade da técnica na análise de SH [54]. A seguir são mostrados os resultados alcançados segundo os diferentes experimentos realizados. Para demonstrar se haveria interação das amostras a pH 4,5 em presença de ácido acético, os padrões foram preparados em mistura, como as amostras húmicas e injetados neste pH.

FIGURA 29 - TEMPO DE RETENÇÃO (minutos) DE POLIESTIRENOSSULFONATOS DE DIFERENTES TAMANHOS MOLECULARES OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO COM DETECTOR DE UV-VIS.

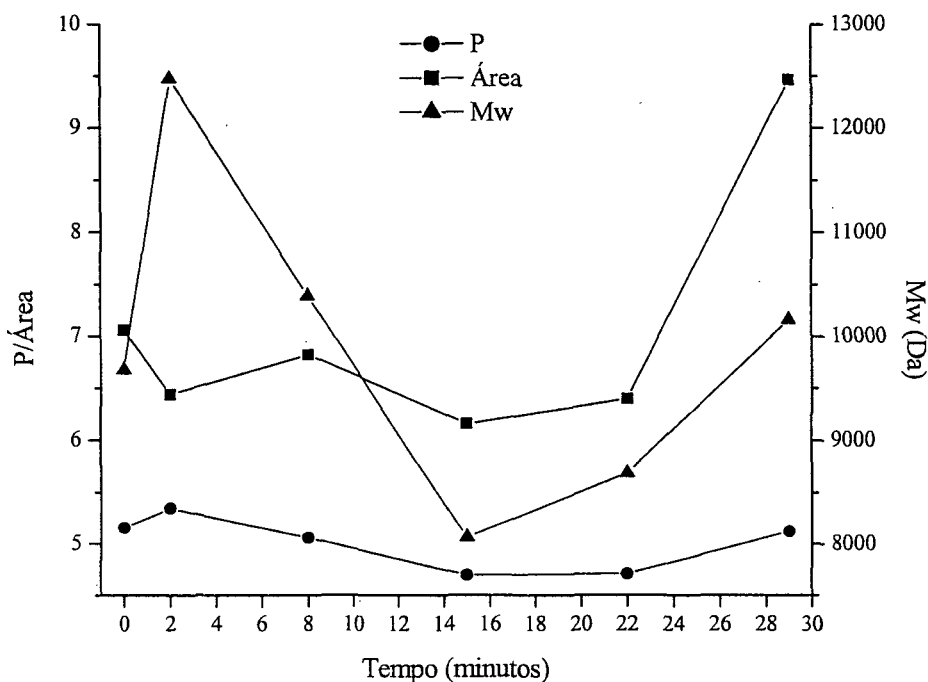


5.3.5.1. Efeito da compostagem sobre a conformação de substâncias húmicas.

Ácidos Húmicos

As massas molares médias (M_w), a polidispersão e a área dos picos das amostras de humato de sódio, ao longo do tempo de compostagem, foram determinados no sistema HPSEC UV-IR e estão representados na Figura 30. Aos dois dias de compostagem houve um aumento maior que 2000 Da nos valores de M_w dos humatos, o que poderia ser decorrente da concentração dos componentes de maior massa molar e de reações de descarboxilação e desmetoxilação via acoplamento oxidativo radicalar, uma vez que, nesta etapa da compostagem, o consumo dos componentes de baixa massa molar ou menos resistentes à biodegradação é intenso. A partir dos dois dias, o M_w diminui até os quinze dias de compostagem (A_3), quando começa novamente a aumentar até o término do processo.

FIGURA 30 - PARÂMETROS DE HPSEC (UV-IR) M_w (Da), POLIDISPERSÃO (P) E ÁREA SOB O PICO ($\times 10^7$) DE HUMATOS DE SÓDIO OBTIDOS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.

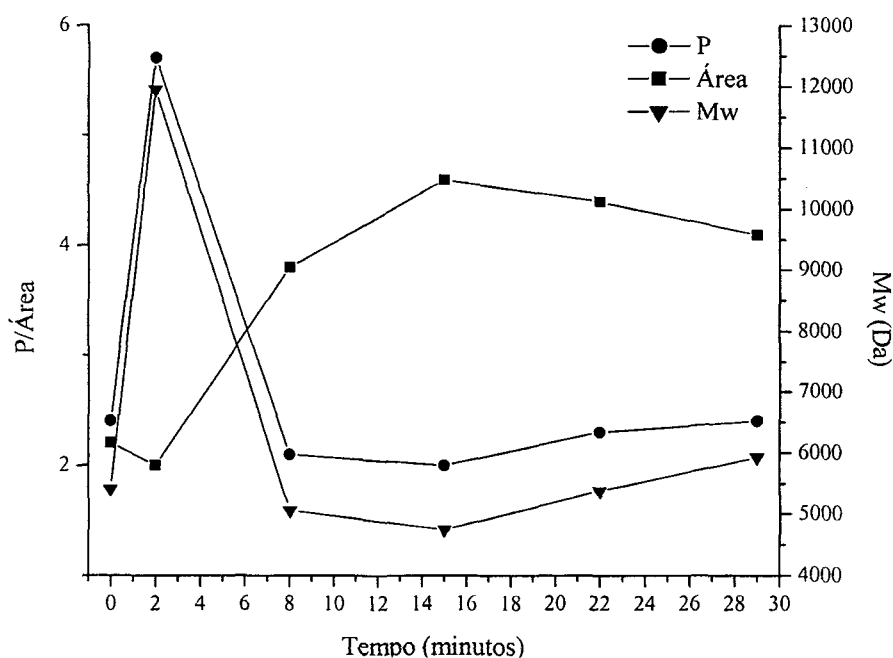


A degradação de componentes, tais como a celulose e hemiceluloses, poderia, em parte, explicar a diminuição dos valores de M_w , enquanto que após os 15 dias, com o início da fase mesófila, espera-se que os processos de humificação se intensifiquem, promovendo o aumento nos valores de M_w . A polidispersão permanece estável ao longo da compostagem refletindo uma relação constante entre os parâmetros M_w e M_n . A área sob o pico também se manteve estável até o vigésimo segundo dia de compostagem e ao término do processo aumentou em quase 30% do valor inicial. A área do pico está diretamente relacionada com a concentração dos grupos cromóforos [55] e, portanto, reflete o aumento destes grupos no final do processo de compostagem, na fase de maturação ou humificação.

Ácidos Fúlvicos

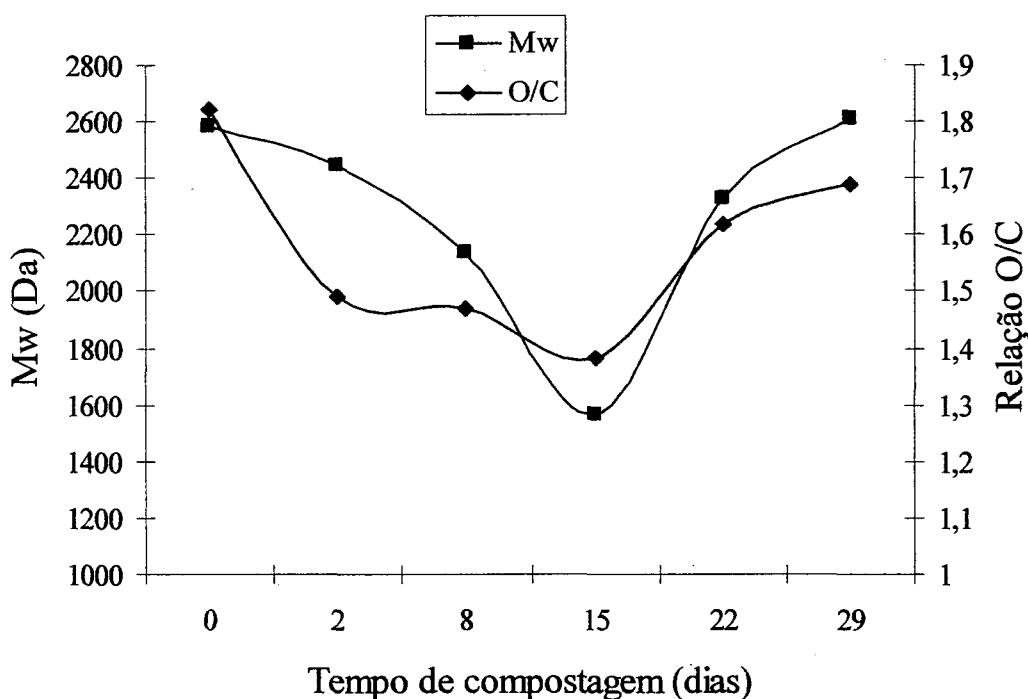
Os cromatogramas das amostras de ácidos fúlvicos ao longo do tempo de compostagem foram obtidos em ambos os sistemas HPSEC (UV-IR e UV-F). Os valores de M_w , a polidispersão e a área dos picos (Figura 31) foram calculados a partir dos cromatogramas obtidos no sistema UV-IR, a $0,2 \text{ g L}^{-1}$.

FIGURA 31 - PARÂMETROS DE HPSEC, M_w , POLIDISPERSÃO (P) E ÁREA SOB OS PICOS ($\times 10^7$) DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM A DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.



A variação do M_w ao longo da compostagem foi de aproximadamente 1000 Da para ambas determinações e poderiam ser explicadas pelas diferenças nos teores relativos de grupos oxigenados nas estruturas húmicas, o que resultaria em diferenças nos arranjos supramoleculares e no tamanho dos agregados resultantes. A correlação linear entre os valores de M_w e a relação O/C da fração AF (Figura 32 e 33) corrobora esta possibilidade.

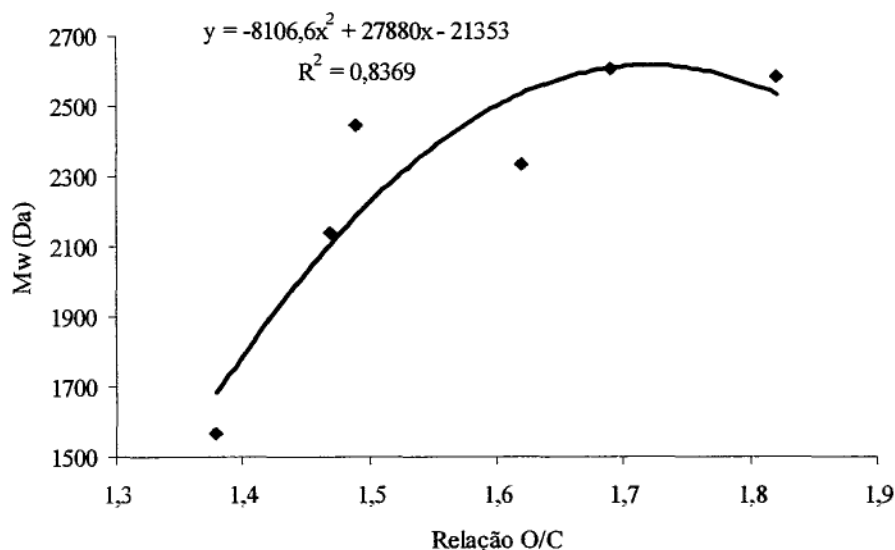
FIGURA 32 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) E RELAÇÃO OXIGÊNIO/CARBONO (O/C) DE ÁCIDOS FÚLVICOS EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM.



Outra possibilidade seria a oxidação parcial de estruturas de maior tamanho molecular, anteriormente presentes na fração AH, tornando-as mais solúveis em valores de pH mais baixo, o que faria com que estes componentes passassem a integrar a fração AF.

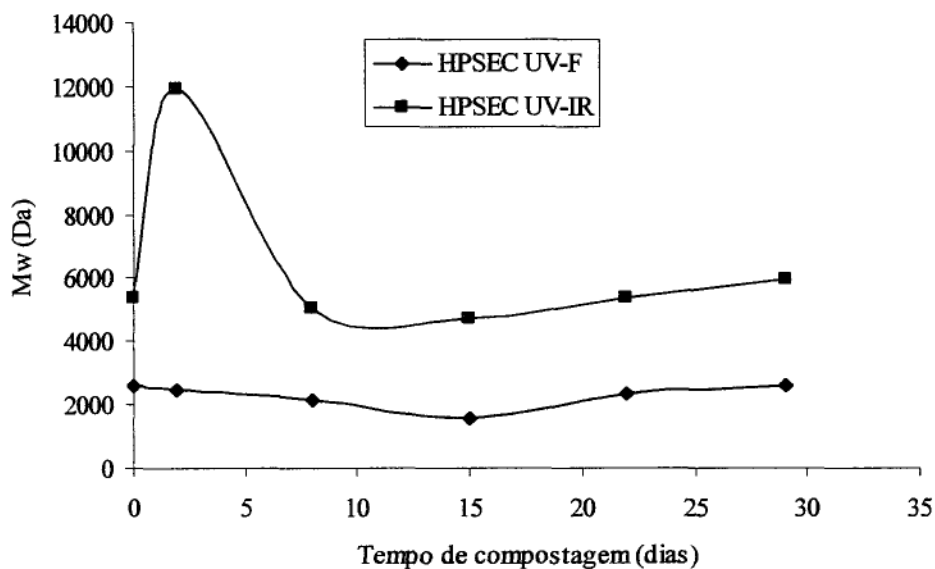
Os resultados acima indicam que no processo de humificação a fração AF parece sofrer os principais processos oxidativos durante o tempo de compostagem de 30 dias. Os valores de M_w , representam massas molares médias relativamente pequenas (entre 800 e 2700 Da à concentração de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ e em torno de 5000 Da à concentração de 2 g L^{-1}).

FIGURA 33 - CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS VALORES DE M_w E RELAÇÃO O/C DE ÁCIDOS FÚLVICOS AO LONGO DA COMPOSTAGEM.



As diferenças de M_w (em torno de 2000 Da) no tamanho molecular das amostras (com exceção da amostra A_1 no sistema UV-IR) determinadas pelos dois sistemas HPSEC (Figura 34), podem ser explicadas pelas diferenças na concentração da amostra (ver página 79, capítulo 5.3.5.3).

FIGURA 34 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) DE ÁCIDOS FÚLVICOS À CONCENTRAÇÃO DE $0,2 \text{ g L}^{-1}$ (HPSEC UV-IR) E À 2 g L^{-1} (HPSEC UV-F), EM DIFERENTES TEMPOS DE COMPOSTAGEM..



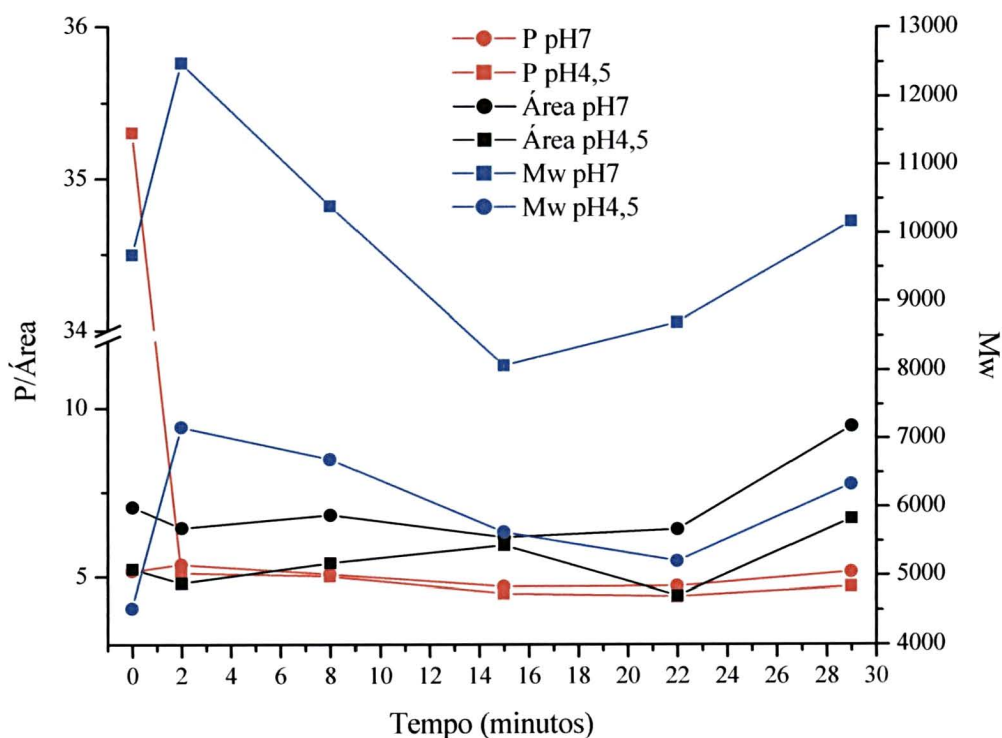
5.3.5.2. *Efeito do pH sobre a estrutura conformacional de substâncias húmicas.*

A conformação das SH em solução depende do pH, da força iônica do solvente e da concentração de SH. As SH são vistas comoovelos encolhidos em pH baixo e força iônica elevada. O tamanho molecular também aumenta com a concentração. De acordo com o modelo macromolecular de Ghosh e Schnitzer [62], a pH constante e em concentrações abaixo de 0.05 g L^{-1} , a forma da SH muda de linear para enovelada com o aumento da força iônica. Por outro lado, à força iônica constante e pH crescente a SH muda de uma conformação enovelada para linear [61].

A Figura 35 mostra a variação dos parâmetros de HPSEC de humatos de sódio ao longo da compostagem. Pode-se notar uma redução sistemática no valor de M_w ao se reduzir o pH do solvente de 7 para 4,5. De acordo com o modelo macromolecular, esta redução poderia ser explicada pela contração das estruturas húmicas decorrente da diminuição das forças repulsivas intramoleculares e pela menor hidratação das moléculas devido à protonação [62].

De acordo com a teoria supramolecular, a redução no tamanho aparente seria devida à desagregação e reorganização das unidades supramoleculares em agregados menores. Este efeito já foi demonstrado por Piccolo e Conte anteriormente [15,54,57]. Estes autores atribuem a diminuição na massa molar aparente das SH às alterações nos arranjos supramoleculares dos componentes húmicos, quando se adiciona ácido orgânico ao eluente. Tal efeito seria de desagregar as estruturas de M_w maiores em estruturas menores, devido às interações carboxílicas protonadas (a pH 4,5), repelindo as carboxilas húmicas e interferindo na estabilidade da estrutura secundária. Este efeito parece ser de mesma intensidade quando se comparam todas as amostras, com exceção da amostra A₃, que apresentou uma diferença de massa molar ligeiramente menor, entre os dois valores de pH estudados. As áreas sob o pico desta amostra não sofreram alterações significativas. A polidispersividade permanece constante nos dois valores de pH, ou seja, a redução nos valores de M_n é também constante e proporcional à redução dos valores de M_w .

FIGURA 35 - PARÂMETROS DE HPSEC M_w (Da), POLIDISPERSIDADE (P) E ÁREA SOB OS PICOS ($\times 10^7$) DE HUMATOS DE SÓDIO OBTIDOS DE COMPOSTO LODO-SERRAGEM SOLUBILIZADOS EM DIFERENTES VALORES DE pH (4,5 E 7).



5.3.5.3. Efeito da concentração de substâncias húmicas sobre suas estruturas conformacionais

Ácidos Fúlvicos

O M_w variou linearmente com a concentração até a concentração de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ quando o valor de M_w diminui e volta a aumentar até a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 36). Até $0,4 \text{ g L}^{-1}$, o efeito conformacional parece ser regido por forças associativas do tipo van der Waals, π - π e CH- π , resultando no aumento do tamanho molecular aparente. A $0,5 \text{ g L}^{-1}$ parece haver alguma alteração no arranjo conformacional dos AF e aqui as forças repulsivas parecem reger a conformação, com a quebra de agregados, resultando numa massa molar aparente menor. Este fato poderia ser explicado pela formação de agregados mais

intimamente ligados, devido ao aumento do número de moléculas em suspensão e, portanto, a maior proximidade entre grupos funcionais ligantes tais como carboxilas e hidroxilas fenólicas. Naturalmente este tipo de comportamento varia com o tipo de AH estudado. Conte&Piccolo, estudando AH de diferentes procedências, encontraram resultados semelhantes aos relatados aqui. Estes autores consideraram que o comportamento conformacional dos AH seria melhor explicado pelo modelo que descreve as SH como associações supramoleculares de moléculas heterogêneas relativamente pequenas, derivadas da degradação ou decomposição de restos biológicos [15].

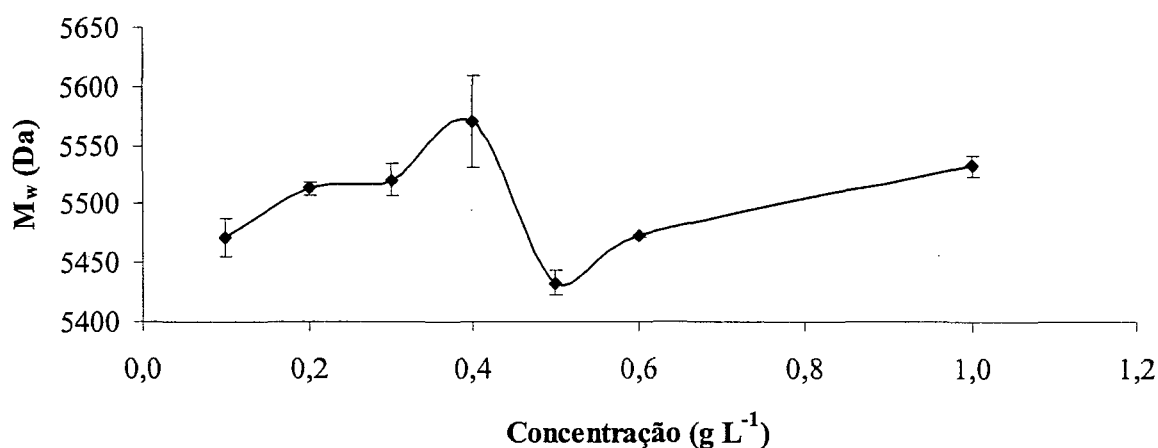
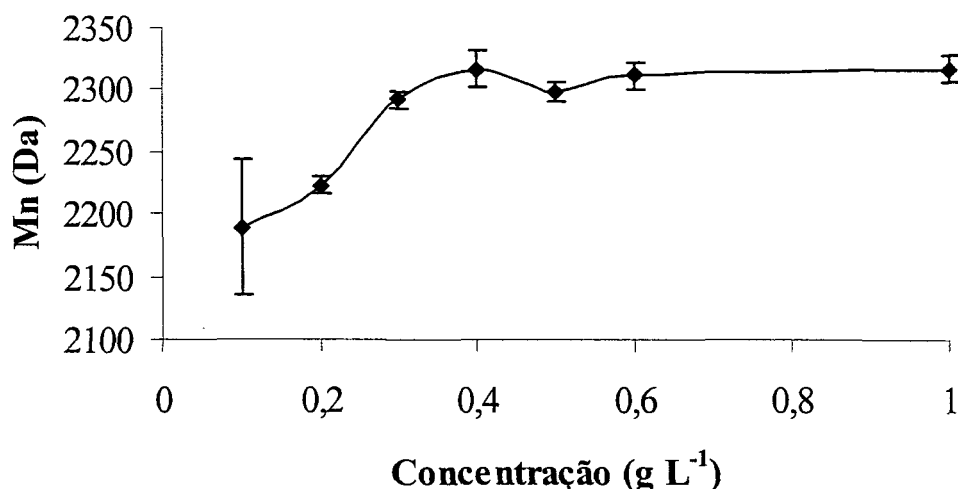


FIGURA 36 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE LODO BIOLÓGICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7.

Os valores de M_n (Figura 37) por outro lado, se mantêm crescentes até a concentração de 0,5 g L^{-1} , quando diminui ligeiramente e se mantêm relativamente constante. Este comportamento se reflete nos valores de polidispersidade (Figura 38), que apresenta forma polinomial, com a diminuição nos valores de P, mostrando que o aumento da concentração leva também a sistemas menos dispersos.

FIGURA 37 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_n) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS FÚLVICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7.



A área sob o pico foi diretamente proporcional à concentração, apresentando coeficiente de correlação R^2 de 0,99 (Figura 39), evidenciando a perfeita correlação entre a concentração de cromóforos e a concentração de moléculas, na faixa estudada. À concentração de 0,5 g L⁻¹, porém, parece haver um ligeiro deslocamento hipercrômico. O hipercromismo pode ser resultante da alteração na proximidade entre cromóforos dos componentes individuais da estrutura húmica. Estes resultados indicam a alteração no arranjo conformacional da estruturas húmicas em torno da concentração de 0,5 g L⁻¹, possivelmente devido à formação de agregados. De acordo com Israelachvili, citado por Conte [61], a intensidade das forças atrativas varia com d^{-6} , onde d é a distância entre moléculas. Quando a concentração é aumentada progressivamente, a distância entre as moléculas húmicas diminui e um aumento na associação de moléculas de tamanho aparente maior pode ocorrer. Por outro lado, quando a distância entre os diferentes componentes húmicos é reduzida devido ao aumento da concentração, os sítios de cargas negativas, os quais estão presentes nas moléculas húmicas a pH 7, produz uma repulsão eletrostática que supera as forças atrativas hidrofóbicas, levando portanto à diminuição do tamanho aparente da associação húmica [61].

FIGURA 38 - POLIDISPERSIDADE ESTIMADA POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE LODO BIOLÓGICO EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7.

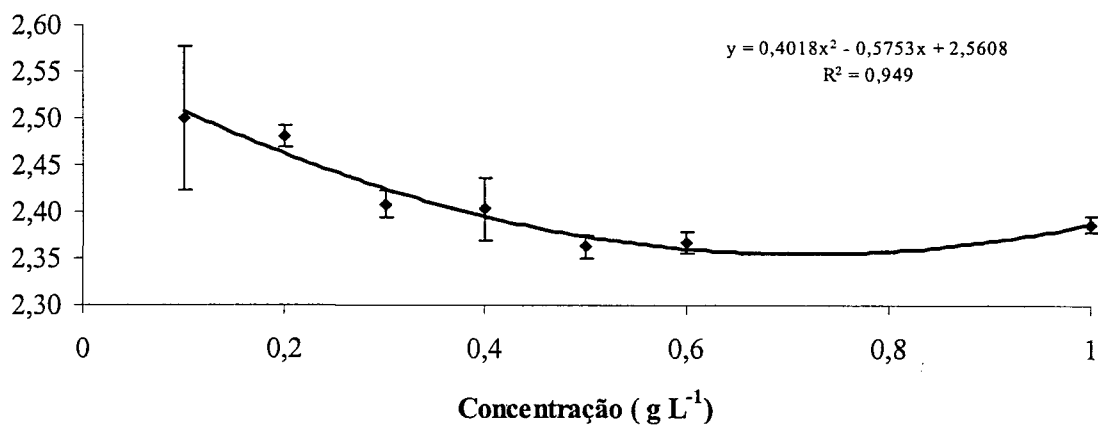
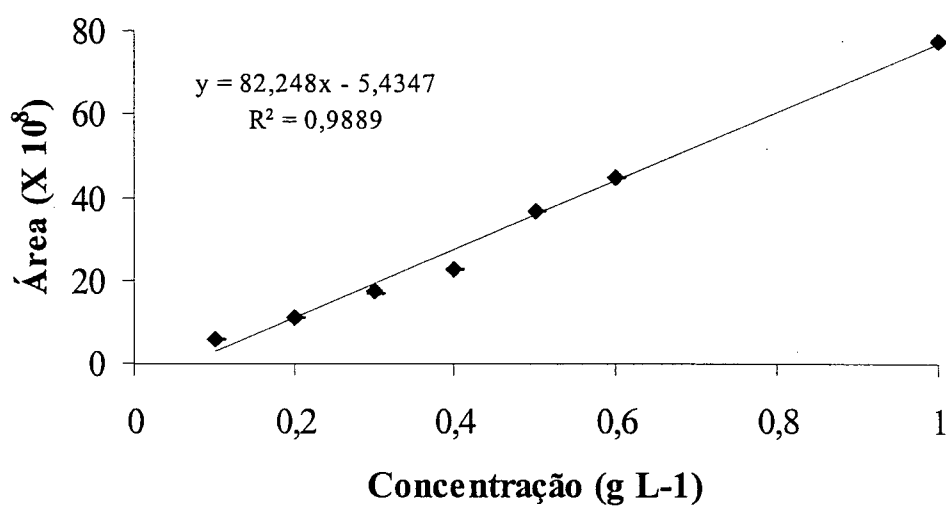


FIGURA 39 - ÁREA SOB O PICO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPSEC UV-IR, DE ÁCIDOS FÚLVICOS EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7, A DIVERSAS CONCENTRAÇÕES.



Ácidos Húmicos

A Figura 40 mostra os cromatogramas dos humatos de sódio em diferentes concentrações em tampão fosfato em pH 7. Entre 0,1 e 0,5 g L⁻¹, os valores de M_w (Figura 41) apresentaram comportamento semelhante àqueles dos ácidos fúlvicos apresentados anteriormente. Entre 0,5 e 1,0 g L⁻¹, porém, o valor de M_w diminuiu em mais de 500 Da e a partir deste valor, a relação entre tamanho molecular e concentração apresenta-se perfeitamente linear.

Em relação aos AF, os AH apresentam tamanho molecular cerca de 3000 Da maior, quando em baixa concentração.

Os valores de M_n apresentaram perfil semelhante aos dos M_w variando, porém, entre 1600 e 2100 Da (Figura 42).

FIGURA 40 - TEMPO DE RETENÇÃO (minutos) EM SISTEMA HPSEC UV-IR DE HUMATOS DE SÓDIO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO EM Ph 7.

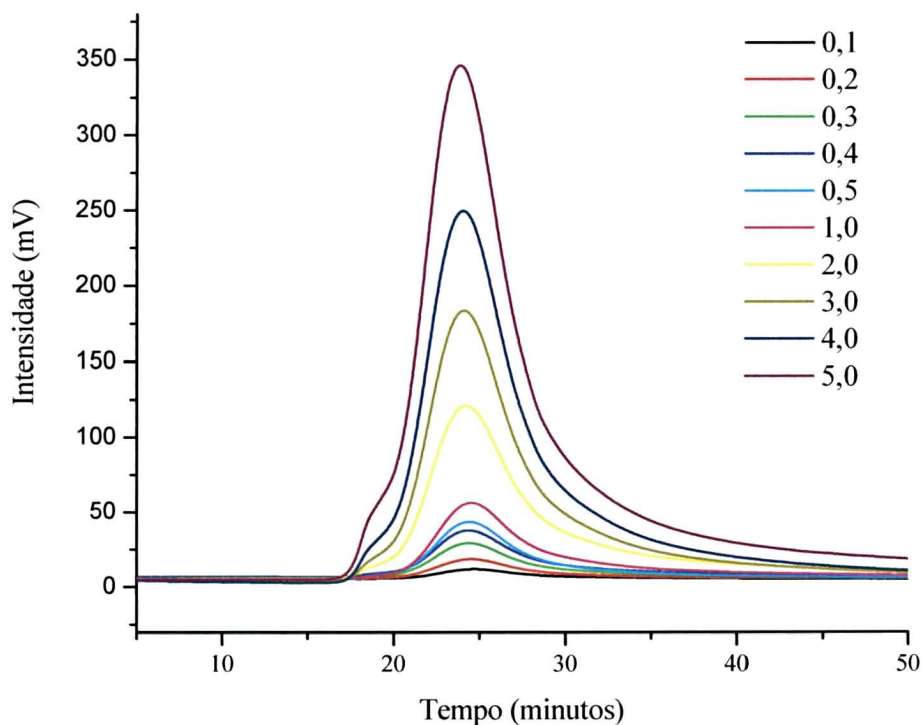


FIGURA 41 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_w) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS HÚMICOS OBTIDOS DE LODO BIOLÓGICO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7.

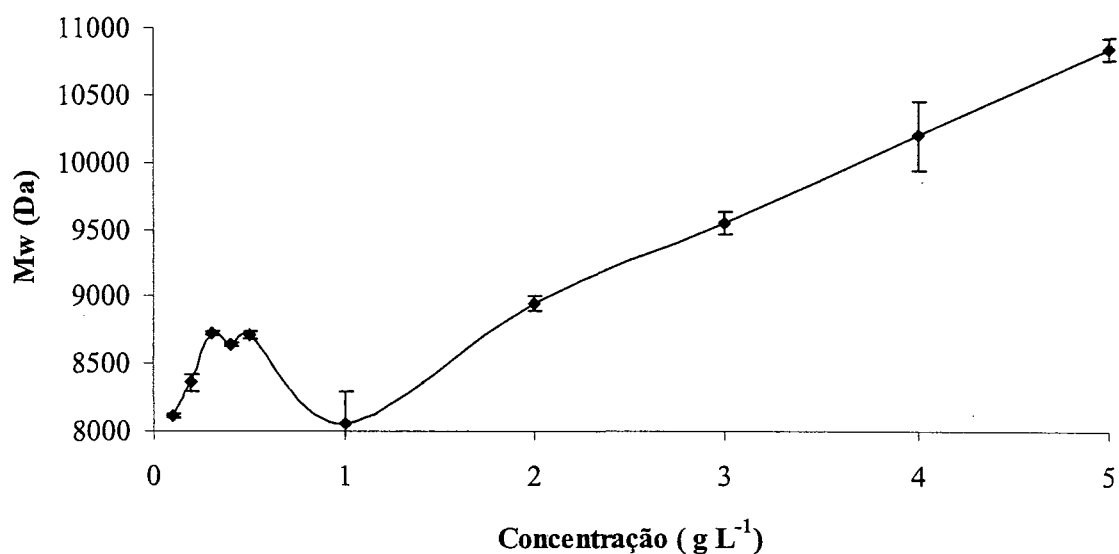
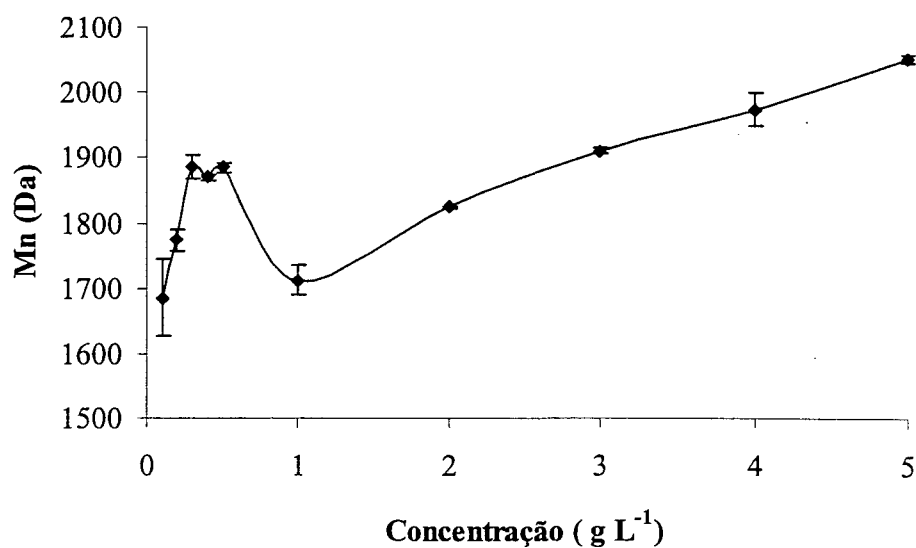


FIGURA 42 - TAMANHO MOLECULAR APARENTE (M_n) ESTIMADO POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS HÚMICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO EM pH 7.



A polidispersividade apresentou uma forte inversão a concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, quando aumentou linearmente com a concentração (Figura 43). Este resultado mostra que, até a concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, as alterações em M_n são mais intensas do que em M_w . A partir desta concentração o processo se inverte. A área sob o pico apresentou-se perfeitamente linear, com o coeficiente de correlação R^2 de 0,99 (Figura 44).

A importância da concentração na avaliação do tamanho molecular de AH é evidente neste estudo, mostrando que o tamanho aparente dos agregados pode variar em 3000 Da, de acordo com a concentração escolhida. Mesmo em soluções diluídas, o tamanho molecular pode variar.

O estudo da variação do tamanho molecular ao longo do tempo de compostagem foi feito a uma mesma concentração. Portanto, em termos relativos, espera-se ter atingido a confiabilidade necessária para interpretação de resultados, ressaltando-se que se considera a variação no tamanho de agregados e não no tamanho real das moléculas húmicas.

FIGURA 43 - POLIDISPERSIDADE DE ÁCIDOS HÚMICOS, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO A pH 7.

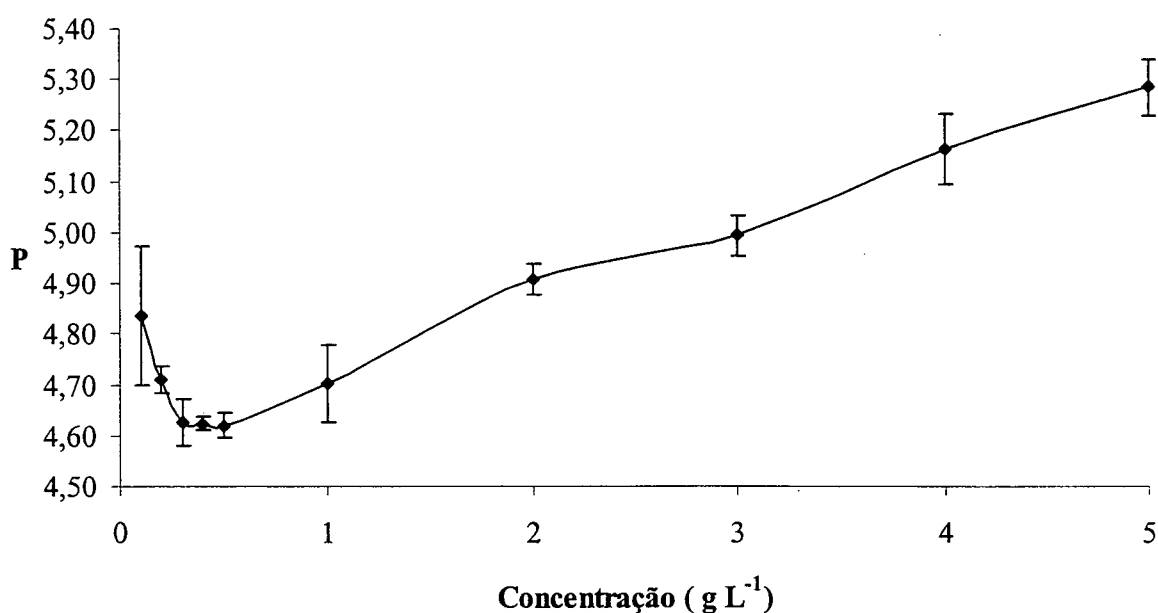
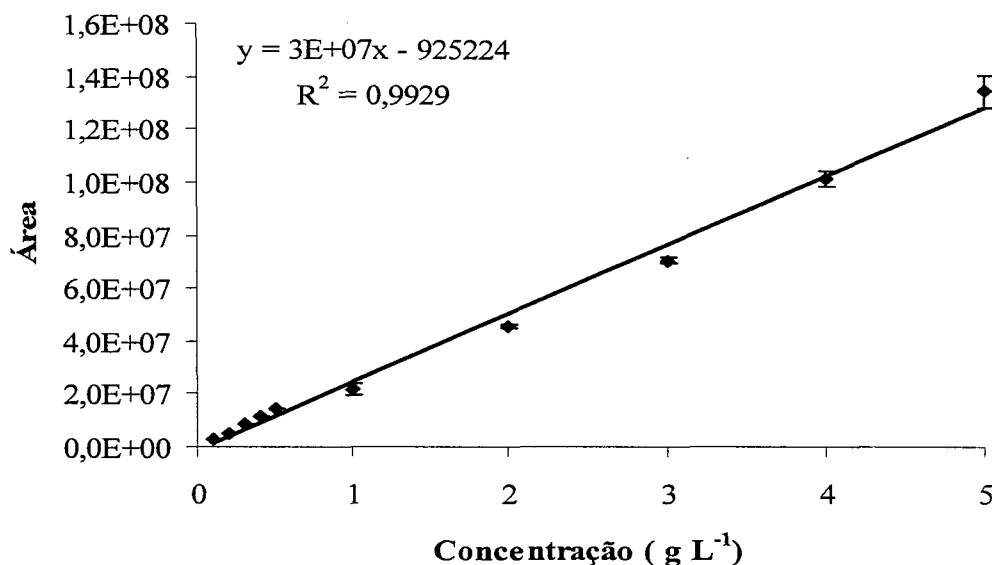


FIGURA 44 - ÁREA SOB O PICO DE CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPSEC UV-IR DE ÁCIDOS HÚMICOS EM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES EM TAMPÃO FOSFATO EM pH 7.



5.3.5.4. *Efeito do contra-íon na estrutura conformacional de humatos*

O tamanho molecular dos humatos de sódio, quando em solução a 0,2 g L⁻¹, se apresentou, em geral, com M_w menores do que os calculados para os humatos de amônio, tanto quando em solução a pH 7, como a pH 4,5 (Tabela 11). Estes resultados podem ser explicados pelas diferenças ocasionadas pela esfera hidratada do Na⁺ e pelo íon NH₄⁺ quando associados aos grupos ácidos dos AH (carboxilas e fenóis) e pelo efeito sobre estas associações intra e intermoleculares [85]. O íon Na⁺ hidratado possibilitaria uma agregação mais íntima entre as diferentes unidades húmicas, com menor conteúdo de água de hidratação, resultando em um tamanho molecular aparente menor.

À concentração de 2 g L⁻¹, no entanto, os humatos de sódio apresentam-se em geral maiores do que os de amônio (Tabela 12), enquanto que estes humatos não variaram seus valores de M_w substancialmente, em ambos sistemas HPSEC e a ambas concentrações.

TABELA 11 - M_w (DETERMINADOS POR SISTEMA HPSEC UV-IR) DE HUMATOS SOLUBILIZADOS ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) EM TAMPÃO FOSFATO EM pH 7 E EM SOLUÇÃO FOSFATO E ÁCIDO ACÉTICO, EM pH 4,5.

Amostra	pH 7				pH 4,5			
	Humato de Sódio		Humato de Amônio		Humato de Sódio		Humato de Amônio	
	M_w^*	SD%	M_w^*	SD%	M_w^*	SD%	M_w^*	SD%
A0	9675	0,04	11375	3,71	4520	1,68	7898	0,12
A1	12475	1,05	11956	4,31	7165	1,53	8176	1,15
A2	10387	1,20	11712	5,40	6688	1,53	8448	0,06
A3	8065	2,36	9407	2,67	5631	0,73	6399	1,32
A4	8687	1,39	10200	5,05	5199	2,22	6335	0,93
A5	10161	4,64	12052	2,28	6321	1,31	8488	1,13

*Média de 3 repetições

Uma possível explicação estaria novamente na formação de agregados mais intimamente ligados nos humatos de sódio menos hidratados. O conteúdo mais baixo de água de hidratação nos humatos de sódio poderia favorecer uma associação hidrofóbica crescente entre agregados de acordo com a concentração. Ao contrário, a estrutura conformacional dos humatos hidratados de amônio parece responder menos ao aumento de concentração [85]. Experimentos anteriores com humatos de sódio de diferentes origens, mostraram uma diminuição de peso molecular com a concentração [61]. Entretanto, este estudo considerou somente concentrações acima de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ e a composição molecular húmica é consideravelmente diferente dos compostos aqui estudados.

A pH 4,5 ocorre uma redução acentuada no M_w calculado, sendo que esta redução é mais intensa nos humatos de sódio do que nos humatos de amônio. A presença do ácido acético, de natureza anfifílica, por conter um grupo metila e uma carboxila, parece dominar as associações hidrofóbicas nas SH, reduzindo o tamanho molecular médio aparente dos agregados [86]. Estes resultados já foram anteriormente observados por Piccolo e Conte [87,88] e são consistentes com a interpretação de que os agregados intimamente ligados dos humatos de sódio são mais suscetíveis ao rompimento provocado pelo ácido acético, do que os humatos de amônio mais hidratados.

TABELA 12 - MASSA MOLAR MÉDIA (M_w) DE HUMATOS (2 g L^{-1}) EM TAMPÃO FOSFATO, A pH 7, E EM SOLUÇÃO FOSFATO E ÁCIDO ACÉTICO, A pH 4,5, EM SISTEMA HPSEC UV-F.

Amostra	pH 7				pH 4,5			
	Humato de Sódio		Humato de Amônio		Humato de Sódio		Humato de Amônio	
	M_w	SD%	M_w	SD%	M_w	SD%	M_w	SD%
A0	12408	4,7	10032	4,7	5631	7,1	4342	7,8
A1	15959	7,0	12230	5,4	9602	2,2	5913	2,8
A2	10649	6,7	12989	2,3	7341	0,6	5842	4,1
A3	9269	0,1	8354	2,9	4285	1,5	4261	3,3
A4	10716	10,4	8719	1,8	4844	3,3	4159	1,7
A5	14737	3,3	10239	1,3	5513	2,9	7084	0,3

*Média de 3 repetições

Finalmente, é possível ainda observar que, de modo geral, todas as medidas mostraram um ligeiro aumento no M_w até a amostra A₂, que corresponde à fase termófila da compostagem. A aeração conduzida nesta etapa teria promovido a degradação da amostra, tornando-a mais oxidada [73] e aumentando seu conteúdo da água de hidratação e, conseqüentemente, seu tamanho molecular aparente. A seguir, ocorre ligeiro decréscimo até a amostra A₃, coincidindo com o fim da fase termófila aerada e início da fase mesófila. Durante a fase da maturação (amostras A₄ e A₅) ocorre novo aumento nos valores médios de M_w , possivelmente em decorrência dos processo de humificação predominante nesta etapa.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi mostrado que o fracionamento com solventes orgânicos antes da extração das frações húmicas se mostrou um bom método de pré-purificação, especialmente por remover os constituintes não húmicos em amostras de resíduos orgânicos, como o lodo biológico de fábrica de celulose e papel.

Na caracterização química do lodo biológico identificaram-se estruturas de complexos de Fe^{3+} em todos os extratos orgânicos acetato de etila, acetona e metanol, mas não no extrato hexano, o qual mostrou especialmente estruturas de hidrocarbonetos alifáticos. A fração alcoólica extraída do lodo foi removida predominantemente no extrato acetato de etila. Complexos octaédricos de Fe^{3+} estavam presentes somente no extrato acetona e na fração húmica humina. O extrato acetona removeu com maior intensidade os componentes ricos em grupos carboxílicos e carboxilatos, sendo que este último é o mais provável grupo doador para formar complexos octaédricos de Fe^{3+} na fração não húmica do lodo.

O lodo apresentou também complexos de Mn^{2+} concentrados principalmente na fração ácido húmico. A interação do íon $\text{Mn}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$ com sítios de complexação da matéria orgânica mostrou cerca de 20% de caráter covalente.

Com relação à compostagem, este processo se mostrou um meio adequado para o estudo detalhado do processo de humificação sob condições relativamente controladas, uma vez que simula os processos ocorridos em ambientes naturais.

Os resultados analíticos mostraram que o ácido húmico extraído do húmus produzido pelo processo de compostagem adotado neste trabalho, era constituído predominantemente de carbono aromático, seguido pela fração alifática. A RMN de ^{13}C CPMAS-DD permitiu verificar que, embora o grau de aromaticidade das amostras de composto não tenha sofrido grande variação, houve um aumento dos C aromáticos

substituídos ao longo da compostagem, devido provavelmente ao aumento de estruturas fenólicas resultantes de processos oxidativos.

Os resultados analíticos mostraram que as frações húmicas do composto apresentaram tamanho molecular aparente entre 800 e 12000 Da, ricos em radicais livres orgânicos e grupos funcionais oxigenados, especialmente carboxilas e fenóis, em complexos metálicos envolvendo principalmente ferro, cobre e manganês.

A variação do tamanho dos agregados durante a compostagem está relacionada a aspectos como aeração, relação O/C e etapa microbiana atuante. O índice de oxidação das estruturas supramoleculares parece reger estas alterações. Em húmus “jovens”, a fração fúlvica parece ser especialmente afetada por estas relações. O modelo clássico de descrição das SH como macromoléculas poliméricas dificilmente explicaria os resultados alcançados nos estudos realizados sobre o efeito da concentração na conformação das SH. Os resultados obtidos parecem concordar com a descrição das SH como associações supramoleculares de moléculas relativamente pequenas, mantidas unidas por forças fracas em sistema de “self-assembly”. Forças atrativas hidrófobas e hidrófilas parecem reger os processos de agregação em soluções diluídas, resultando em agregados de tamanhos moleculares maiores com o aumento da concentração. A repulsão eletrostática predominante quando um limite crítico de concentração é ultrapassado, faz com que os tamanhos dos agregados moleculares se tornem menores. A interação das SH com espécies anfífilas tais como ácidos orgânicos, parece atuar especialmente desta forma.

Reações de descarboxilação e desmetoxilação via acoplamento oxidativo radicalar mediado por enzimas, são propostas em ambientes de intensa atividade microbiana, como é a fase termófila da compostagem.

A técnica HPSEC é uma ferramenta de separação muito promissora no estudo conformacional de frações húmicas. Devido à grande diversidade de conformação estrutural que as SH podem adotar de acordo com os parâmetros analíticos, esta técnica deve ser usada com bastante rigor no controle dos parâmetros analíticos, tais como concentração, pH do eluente e temperatura de trabalho. A conjugação da técnica cromatográfica com técnicas espectroscópicas, tais como ressonância paramagnética eletrônica, aumenta enormemente o potencial de compreensão dos processos e das estruturas secundárias das moléculas

húmicas, uma vez que os dados espectroscópicos podem confirmar a presença e/ou a ausência dos diversos grupos funcionais e suas intensidades relativas.

Os estudos realizados sobre a caracterização de moléculas húmicas durante o processo de compostagem, levam a novas e importantes interpretações sobre os processos de formação de substâncias húmicas e também para a condução mais eficiente da produção de composto como fertilizante orgânico.

Este trabalho foi importante para novas interpretações das SH como associações supramoleculares, cujos desdobramentos têm grandes implicações no manejo de solos e do ambiente, com aplicações diretas em tecnologias de recuperação de solos contaminados com pesticidas ou outros resíduos orgânicos tóxicos, de minimização de riscos de erosão e de desertificação de solos, de controle de emissão de CO₂, através do uso de húmus mais estáveis e ainda de manejo de nutrientes, uma vez que as SH, quando associadas a fertilizantes químicos inorgânicos, podem servir como matrizes ligadas a íons nutrientes, atuando como fertilizantes de liberação controlada, resultando em economia de recursos e menor impacto negativo no ambiente.

Finalmente, a produção de húmus a partir de resíduos orgânicos agroflorestais ou industriais representa uma contribuição importante na reciclagem e imobilização do carbono nos ecossistemas terrestres. O desenvolvimento de tecnologias adequadas à produção de húmus para estocar carbono no solo deve considerar, portanto, a qualidade e estabilidade de seus componentes húmicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRAUN, R., STEFFEN, R., **Anaerobic digestion of agroindustrial byproducts and wastes**. Dep. Environ. Biotechnol., Institute for Agrobiotechnology, University of Agricultural Sciences, A-3430 Tulln, Konrad Lorenzstrasse, Austria, 1997. Disponível em: <<http://www.fao.org/sd/EGdirect/EGre0015.htm>>. Acesso em: 10 set.2003, 16:30.
- [2] FONTES, P.J.P., **Auto-suficiência energética em serraria de *Pinus* e aproveitamento dos resíduos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.
- [3] SCHLESINGER, W.H., **Biogeochemistry: An Analysis of Global Change**, 2nd ed., San Diego, California, Ed. Academic, 1997.
- [4] PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO, **Manual Prático para a compostagem de biossólidos**. Rio de Janeiro, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999.
- [5] PEREIRA NETO, J.T. **Manual de Compostagem**. Belo Horizonte, UNICEF, 1996. 56 p.
- [6] VEEKEN, A., NIEROP, K., WILDE, V., HAMELERS, B. Characterization of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 33-41, 2000.
- [7] JEZIERSKI, A., DROZD, J., JERZYKIEWICZ, M., CHEN, Y., KAYE, K.J. EPR in the environment control: copper complexes and free radicals in soil and municipal solid waste compost. **Applied Magnetic Resonance**, v. 14, p. 275-282, 1998.
- [8] KOSTOV, O., PETKOVA, G. Microbial indicators for sawdust and bark compost stability and humification processes. **Bioresource Technology** v. 50, p. 193-200, 1994.

- [9] SCHULTEN, H.-R., SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, p. 487-498, 1995.
- [10] SENN, T. L., KINGMAN, A. R. **A review of humus and humic Acids**. S. C. Agricultural Experiment Station, Research Series No. 145, Clemson [online]. [cited 2002-12-13], <http://www.livearth.com/articles/art2.htm> 1973. Disponível em: <http://www.livearth.com/articles/art2.htm>. Acesso em: 13 dez. 2002.
- [11] MACCARTHY, P. The Principles of humic substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 738-751, 2001.
- [12] WERSHAW, R.L. Molecular aggregation of humic substances. **Soil Science**, v. 164, n. 11, p. 803-813, 1999.
- [13] MACHADO, P.L.O. A. **Húmus da Terra?" Afinal, o que é e para que serve?, Perguntas mais freqüentes sobre solos**. <http://www.cnps.embrapa.br>, 1999. Disponível em: <http://www.cnps.embrapa.br/search/pesqs/faqfert2/faqfert2.html>. Acesso em: 23 out. 2003.
- [14] STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions**. 2nd ed., N.Y., Ed. J. Wiley, 1994.
- [15] PICCOLO, A. The supramolecular structures of humic substances. **Soil Science**, v. 166, p. 810-832, 2001.
- [16] HAYES M. H. B., CLAPP, C.E. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structures, and environmental influences. **Soil Science**, v. 166, p. 723-737, 2001.
- [17] SMEJKALOVÁ, D. **Characterization and fractionation of humic substances from lignite**. Monografia (Diploma Thesis), Univ. Brno, 2003.

- [18] ANDERSON, H.A., BICK, W., HEPBURN, A., STEWART, M. Nitrogen in humic substances, *in*: Hayes, M., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. (Ed.) **Humic Substances II, in search of structure**. N.Y, J.Wiley & Sons, 1989.
- [19] VARADACHARI, C., GHOSH, K. On humus formation. **Plant and Soil**, v. 77, p. 305-313, 1984.
- [20] DEC, J., HAIDER, K., BOLLAG, J.-M. Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions. **Chemosphere**, v. 52, p. 549-556, 2003.
- [21] von WANDRUSKA, R. The micellar model of humic acid: evidence from pyrene fluorescence measurements. **Soil Science**, v. 163, n. 12, p. 921-930, 1998.
- [22] von WANDRUSKA, R., SCHIMPF, M., Hill, M., ENGEBRETSON, R., Characterization of humic acid size fractions by SEC and MALS. **Organic Geochemistry**, v. 30, p. 229-232, 1999.
- [23] SIMPSON, A. J., KINGERY, W. L., HAYES, M. H. B., SPRAUL, M., HUMPFER, E., DVORTSAK, P., KERSSEBAUM, R., GODEJOHANN, M., HOFFMANN, M. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 84-88, 2002.
- [24] HEDGES, J.I., EGLINTON, G., HATCHER, P.G., KIRCHMAN, D.L., ARNOSTI, C., DERENNE, S., EVERSLED, R.P., KÖGEL-KNABER, I., LEEUW, J.W., LITKE, R., MICHAELIS, W., RULLKÖTTER, J. The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. **Organic Geochemistry**, v. 31, p. 945-958, 2000.
- [25] BURDON, J. Are the traditional concepts of structures of humic substances realistic? **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 752-769, 2001.

- [26] Laboratório de Cristalografia Estereodinâmica e Modelagem Molecular. **Linhas de pesquisa**. Universidade de São Carlos, São Carlos. Disponível em: <<http://www.dq.ufscar.br/Labs/LACREMM/supra.html>>. Acesso em: 24 out. 2003.
- [27] ARAKI, K., TOMA, H.E. Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 962-975, 2002.
- [28] MOORE, J.S. Molecular architecture and supramolecular chemistry. **Solid State & Materials Science**, p. 777-788, 1996.
- [29] LEHN, J.-M. Supramolecular Chemistry, VCH, Weinheim, p.7, 1995, citado por Piccolo, A., The supramolecular structures of humic substances. **Soil Science**, v. 166, p. 810-832, 2001.
- [30] MACHADO, V.G., MANGRICH, A.S., LEHN, J.-M. Inorganic self-assembly through sequential complexation in the formation of bimetallic and trimetallic architectures from multisite ligands based on 5,5'-disubstituted 2,2'-bipyridines. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 777-789, 2003.
- [31] SWIFT, R. Macromolecular properties of soil humic substances: fact, fiction, and opinion. **Soil Science**, v. 164, p. 790-802, 1999.
- [32] JANOŠ, P. Separation methods in the chemistry of humic substances. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 1-18, 2003.
- [33] SCHNITZER, M., KHAN, S.V. editors, **Soil organic matter**, Developments in soil science, v. 8, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co., 1978. 309 p.
- [34] NANNY, M.A., MINEAR, R.A., LEENHEER, J.A. **Nuclear magnetic resonance spectroscopy in environmental chemistry**. Oxford, Oxford University Press, 1997. 326 p.
- [35] SILVA, N.M., MENEZES, S.M.C. **Introdução à ressonância magnética nuclear no estado sólido**. Apostila de treinamento do CENPES, Rio de Janeiro, 2002.

- [36] PRESTON, C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. **Soil Science**, v. 161, n. 3, p. 144-166, 1996.
- [37] PRESTON, C.M. Carbon-13 solid-state NMR of soil organic matter – using the technique effectively. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 81, n. 3, p. 255-270, 2001.
- [38] DINEL, H., SCHNITZER, M., SCHULTEN, H.-R. Chemical and Spectroscopic characterization of colloidal fractions separated from liquid hog manures. **Soil Science**, v.163, n. 8, p. 665-673, 1998.
- [39] CHEN, Y; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratio. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 41, p. 352-358, 1977.
- [40] SENESI, N. Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. **Advances in Soil Science**, v. 14, p. 77-130, 1990.
- [41] NOVOTNY, E.H.; BLUM, W.E.H.; GERZABEK, M.H., MANGRICH, A. S. Soil management system effects on size fractionated humic substances. **Geoderma**, v. 92, n. 1-2, p. 87-109, 1999.
- [42] PICCOLO, A. e MIRABELLA, A. Molecular weight distribution of peat humic substances extracted with different inorganic and organic solutions. **The Science of the Total Environmental**, v. 62, p. 39-46. 1987.
- [43] RAUSA, R., MAZZOLARI, e CALEMMMA, V. Determination of molecular size distribution of humic acids by high-performance size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 541, p. 419-429, 1991.
- [44] PICCOLO, A., CELANO, G., CONTE, P. Methods of isolation and characterization of humic substances to study their interactions with pesticides. in

Pesticides/ Soil Interactions, Some current research methods, Cornejo, J. and Jamet, P., Coord., INRA ed., p. 103-116, 2000.

[45] PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 373-380, 1992.

[46] PICCOLO, A., CELANO, G., De SIMONE, C., Interactions of atrazine with humic substances of different origins and their hydrolyzed products. **The Science of the Total Environmental**, 117/118, 403-412, 1992.

[47] PICCOLO, A., CELANO, G., CONTE, P. Adsorption of Glyphosate by humic substances. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, p. 2442-2446, 1996.

[48] de HAAN, H., JONES, R.I., SALOMER, K. Does ionic strength affect the configuration of aquatic humic substances, as indicated by gel filtration? **Freshwater Biology**, v. 17, p. 453-459, 1987.

[49] CECCANTI, B. CALCINAI, M., BONMATI-PONT, M., CIARDI, C., TARSITANO, R. Molecular size distribution of soil humic substances with ionic strength. **Science Total Environmental**, v. 81/81, p.471-479, 1989.

[50] BERDEN, M., BERGGREN, D. Gel filtration chromatography of humic substances in soil solutions using HPLC-determination of the molecular weight distribution. **Journal of Soil Science**, v. 41, p. 61-72. 1990.

[51] CHIN, YU-PING, AIKEN, G., O'LOUGHLIN E. Molecular weight polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 1853-1858, 1994.

[52] PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. **Chemosphere**, v. 33, n. 4, p. 595-602, 1996.

- [53] PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. **European Journal of Soil Science**, v. 47, p. 319-328, 1996.
- [54] CONTE, P., PICCOLO, A. High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) of humic substances: molecular sizes, analytical parameters, and columns performance. **Chemosphere**, v. 38, p. 517-528, 1999.
- [55] MORI, S., BARTH, H.G. **Size Exclusion Chromatography**, New York, Ed. Springer, 1999. 234 p.
- [56] CAMERON, R.S., SWIFT, R.S., THORNTON, B.K., POSNER, M.A. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. **Journal of Soil Science**, v. 23, p. 395-408, 1972.
- [57] CONTE, P., PICCOLO, A. Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 1682-1690, 1999.
- [58] AYOMA, M. Use of High Performance Size Exclusion Chromatography to monitor the dynamics of water-soluble organic substances during the decomposition of plant residues in soil. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 21-30, 1996.
- [59] MANO, E.B. **Introdução a Polímeros**, São Paulo, Ed. Edgar Blücher Ltda., 1986. 111 p.
- [60] YAU, W.W., KIRKLAND, J.J., BLY, D.D. **Modern Size Exclusion Chromatography**. New York, Ed. Wiley Interscience, 1979.
- [61] CONTE, P. and PICCOLO, A. Effect of concentration on the self-assembling of dissolved humic substances. **Developments in Soil Science**, v. 28A, p. 409-417, 2002.

- [62] GHOSH, K., SCHNITZER, M. Macromolecular structures of humic substances. **Soil Science**, v.129, p. 266-276, 1980.
- [63] International Humic Substances Society. **Método de extração de ácidos húmicos e fúlvicos**. Disponível em: <<http://www.ihss.gatech.edu>>. Acesso em: 3 mai 2000.
- [64] GUIMARÃES, E., MANGRICH, A.S., MACHADO, V.G., TRAGHETTA, D.G., LOBOC, M.A. Criterious preparation and characterization of earthworm-composts in view of animal waste recycling. Part II. A synergistic utilization of EPR and ¹H NMR spectroscopies on the characterization of humic acids from vermicomposts. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 734-741, 2001.
- [65] SANTOS, G.A., CAMARGO, F.A.O. editores, **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**, Porto Alegre, Gênese Edições, 1999. 508 p.
- [66] BUDZIAK, C.R., MAIA, C.M.B.F., MANGRICH, A.S. Grupos ácidos e capacidade de oxidação de ácidos húmicos como método de avaliação da compostagem de *Pinus taeda*. In: V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, Curitiba. **Anais eletrônicos...**Curitiba: UFPR, 2003.
- [67] TurboSEC for TurboSEC Client/Server and Turbochrom Workstation – **User' Guide**, Perkin Elmer, Norwalk, USA, 1999.
- [68] MAIA, C. M. B. F., MANGRICH, A. S., SIMONELLI, F. Spectroscopic characterization of organic structures and organic-inorganic interactions on paper mill sludge. **Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica**, v. 28, n. 7, p. 372 - 377, 2001.
- [69] EVMIRIDIS, N.P. Effect of Crystal-Structure and Percentage of Ion-Exchange on Electron-Spin-Resonance Spectra of Hydrated Fe (III) Ion-Exchanged Synthetic Zeolites. **Inorganic Chemistry**, v. 25, p. 4362-4369, 1986.

- [70] GOMES, R.C., MANGRICH, A.S., COELHO, R.R.R., LINHARES, L.F. Elemental, Functional Group and Infrared Spectroscopic Analysis of Actinomycetes Melanins from Brazilian Soils. **Biology & Fertility of Soil**, v. 21, p. 84-88, 1996.
- [71] PAIM, S., LINHARES, L.F., MANGRICH, A.S. and MARTIN, J.P. Characterization of Fungal Melanins and Soil Humic Acids by Chemical Analysis and Infrared Spectroscopy. **Biology & Fertility of Soil**, v. 10, p. 72-76, 1990.
- [72] MANGRICH, A.S., LERMEN, A.W., SANTOS, E.J., GOMES, R.C., COELHO, R.R.R., LINHARES, L.F., SENESI, N. EPR and UV-vis spectroscopic evidence for copper porphyrin in actinomicetes melanins from Brazilian soils. **Biology & Fertility of Soil**, v. 26, p. 341-345, 1998.
- [73] BUDZIAK, C.R. **Grupos ácidos e capacidade de oxidação de ácidos húmicos como método de avaliação de processos de compostagem**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, UFPR, Curitiba, 2002.
- [74] JEZIERSKI, A., DROZD, J., JERZYKIEWICZ, M., CHEN, Y., KAYE, K.J. EPR in the environment control: copper complexes and free radicals in soil and municipal solid waste compost. **Applied Magnetic Resonance**, v. 14, p. 275-282, 1998.
- [75] CONTE, P., PICCOLO, A., VAN LAGEN, B., BUURMAN, P. de JAGER, P.A. **Geoderma**, v. 80, p. 327, 1997.
- [76] ALMENDROS, G., FRÜND, R., VILA, F.J.G.-., HAIDER, K.M., KNICKER, H., LÜDEMANN, H.-D. **FEBS Lett.**, v. 282, p. 119, 1991.
- [77] BUDZIAK, C.R., MAIA, C.M.B.F., MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira, **Química Nova**, no prelo.
- [78] BELLAMY, L.J. **The infrared spectra of complex molecules**. 3rd., London, Ed. Chapman and Hall, 1975.

- [79] MANGRICH, A.S. Comunicação pessoal, **2003**.
- [80] RUMPEL, C., JANIK, L.J., SKJEMSTAD, J.O., KÖGEL-KNABNER, I. Quantification of carbon derived from lignite in soils using mid-infrared spectroscopy and partial least squares. **Organic Geochemistry**, v. 32, p. 831–839, 2001.
- [81] HABERHAUER, G. and GERZABEK, M.H. Drift and transmission FT-IR spectroscopy of forest soils: an approach to determine decomposition processes of forest litter. **Vibrational Spectroscopy**, v. 19, p. 413–417, 1999.
- [82] JEZIERSKI, A., CZECHOWSKI, F., JERZYKIEWICZ, M., GOLONKA, I., DROZD, J., BYLINSKA, E., CHEN, Y., SEAWARD, M.R.D. Quantitative EPR study on free radicals in the natural polyphenols interacting with metal ions and other environmental pollutants. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 58, p. 1293–1300, 2002.
- [83] MARCHE, T., SCHNITZER, M., DINEL, H., PARÉ, T., CHAMPAGNE, P., SCHULTEN, H.-R., FACEY, G. Chemical changes during composting of a paper mill sludge-hardwood sawdust mixture. **Geoderma**, v. 116, n. 3-4, p. 345-356, 2003.
- [84] STAINSACK, J., MANGRICH, A.S., MAIA, C.M.B.F., MACHADO, V.G., SANTOS, J.C.P., NAKAGAKI, S. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin. **Inorganica Chimica Acta**, v. 356, p. 243-248, 2003.
- [85] MAIA, C.M.B.F., CONTE, P., PICCOLO, A., MANGRICH, A.S. Exclusion chromatography of sodium and ammonium humates extracted from compost of sawdust and paper mill sludge. In: V Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, Curitiba. **Anais eletrônicos...**Curitiba: UFPR, 2003.
- [86] PICCOLO, A., CONTE, P. Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances compared with macromolecular polymers. **Soil Science**, v. 166, p. 174-185, 2001.

- [87] PICCOLO, A., CONTE, P. Molecular size of humic substances: Supramolecular associations versus macromolecular polymers. **Advanced Environmental Research**, v. 3, p. 508-521, 2000.
- [88] PICCOLO, A., CONTE, P., COZZOLINO, A. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. **European Journal of Soil Science**, v. 50, p. 687-694, 1999.

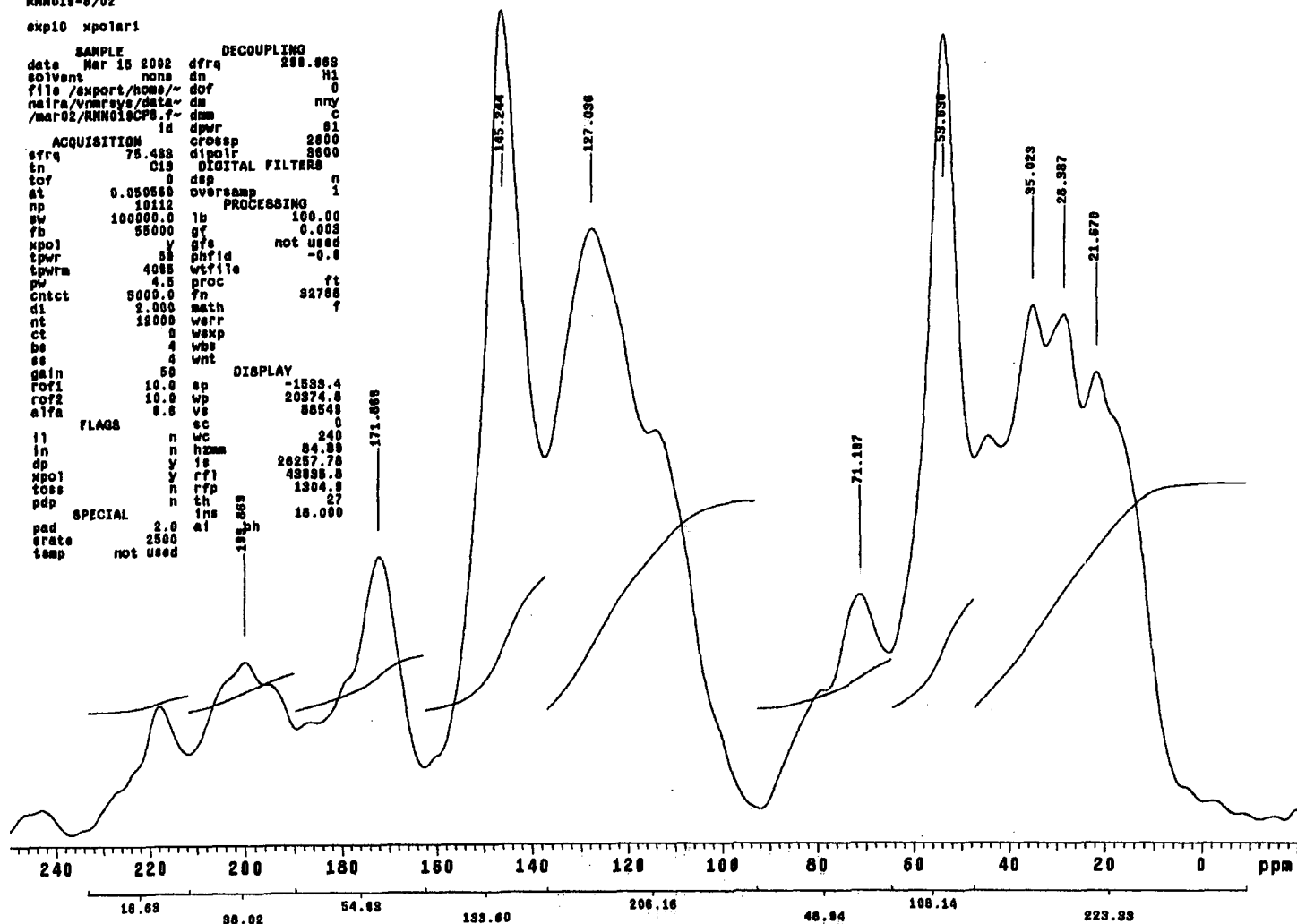
ANEXO I

ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO TREZE

AH AD
 13C CPMA5 D1-25 CNTCT=5000 NT=12000
 PROBE VARIAN VT 7MM VEL=5500MHZ
 RNN010-8/02

exp10 xpolar1

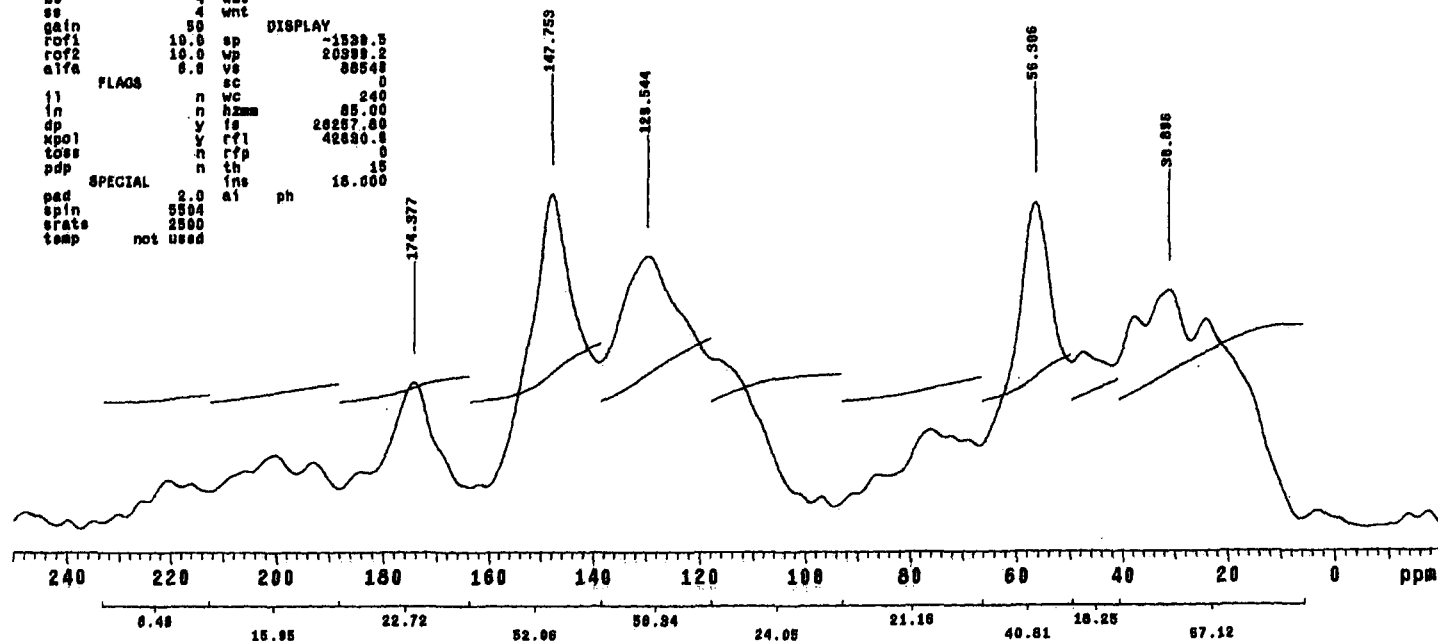
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 15 2002	dfrq	200.988
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dof	0
naira/vnmrsvs/data~	da	nny	
/mar02/RNN010CP5.f~	dmm	c	
	id	dpr	61
ACQUISITION		crossp	
effq	75.488	dipolr	2800
tn	019	DIGITAL FILTERS	
tof	0	dsp	n
at	0.050560	oversamp	1
np	10112	PROCESSING	
sw	100000.0	lb	100.00
fb	55000	gf	0.003
xpol	y	gfs	not used
tpwr	58	phfid	-0.8
tpwrn	4088	wtfile	
pw	4.5	proc	ft
cntct	5000.0	fn	32768
d1	2.000	math	f
nt	12000	werr	
ct	0	wexp	
be	4	wss	
ss	4	wnt	
gain	50	DISPLAY	
rof1	10.0	sp	-1533.4
rof2	10.0	wp	20374.8
alfa	0.6	ve	88548
FLAGS		sc	0
ll	n	wc	240
ln	n	hnm	84.88
dp	y	is	28257.78
xpol	y	rfl	43838.8
cosc	n	rpf	1304.8
pdp	n	th	27
SPECIAL		ins	16.000
pad	2.0	ai	
erate	2500		
temp	not used		



HA A1
 13C CPNAB CNTCT-5000 01-28
 PROBE VARIAN 7MM VT VEL-5500HZ
 RMN019-1/02

exp10 xpolar1

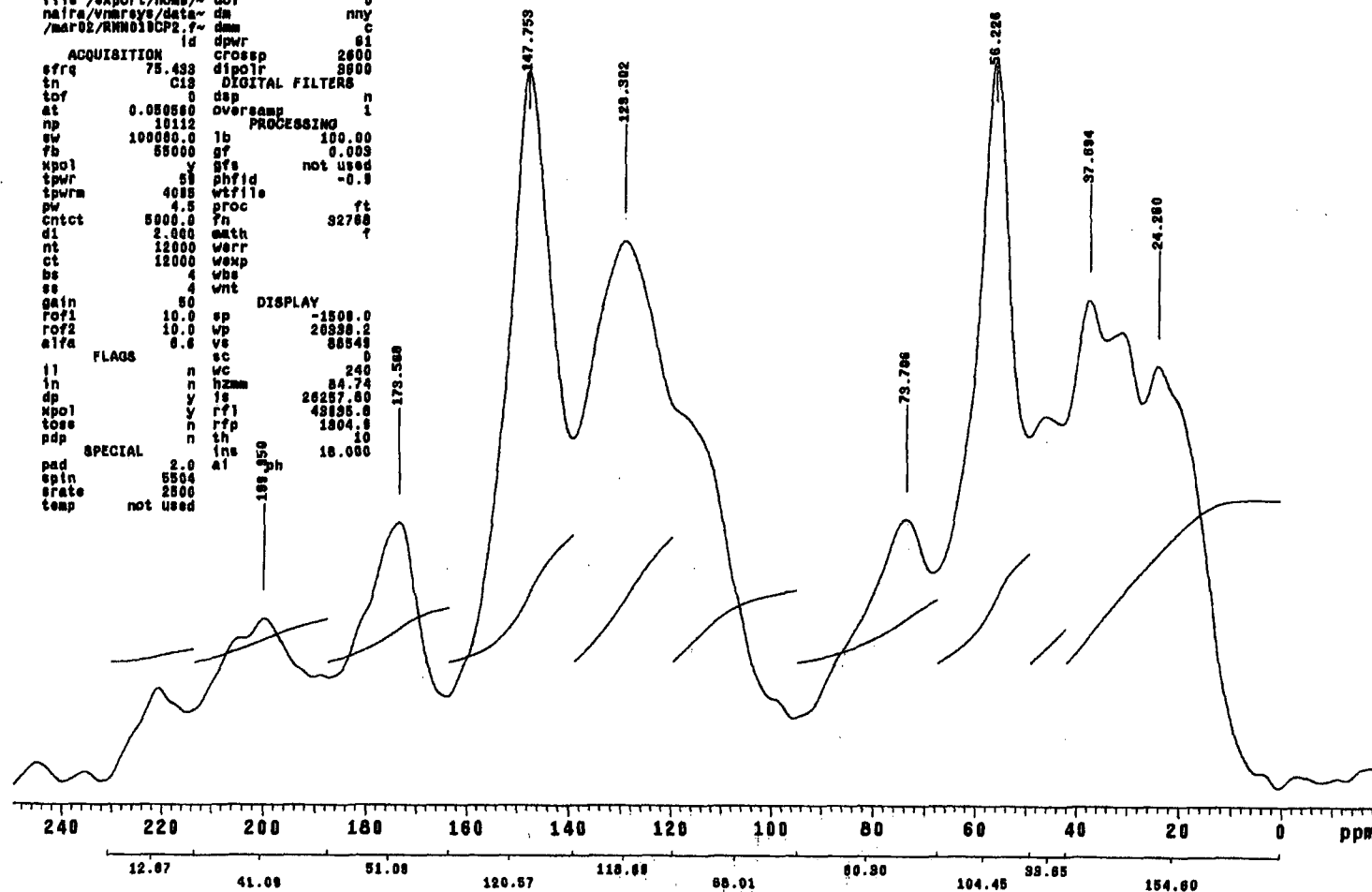
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 8 2002	dfrq	248.463
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dof	0
name	/var02/RMN019CP1.f	da	nny
		dsm	c
ACQUISITION		id	spwr
strq	75.493	ctoss	2800
tn	C12	dipolr	3800
tof	0	DIGITAL FILTERS	
at	0.050550	dsp	n
np	10112	oversamp	1
sw	100000.0	lb	100.00
fb	55000	gt	0.003
xpol	y	stf	not used
tpwr	50	phfid	-0.0
tpwrn	4005	wtfile	
pw	4.8	proc	ft
cntct	5000.0	fn	32768
d1	2.000	math	f
nt	12000	werr	
ct	12000	wexp	
bs	4	wss	
ss	4	wnt	
gain	50	DISPLAY	
rof1	10.0	sp	-1538.5
rof2	10.0	wp	20399.2
alfa	0.0	vs	88548
FLAGS		sc	0
fl	n	wc	240
in	n	h2mm	85.00
dp	y	ls	28257.80
xpol	y	rfl	42880.8
toes	n	rff	0
pdp	n	th	15
SPECIAL		ins	18.000
pad	2.0	ai	ph
spin	5504		
erate	2500		
temp	not used		



HA A2
 13C CPNMR CMTCT-5000 D1-28 NT-12000
 PROBE VARIAN 7MM VT VEL-5500HZ
 RMN019-2/02

exp10 xpolari

SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 11 2002	dfrq	250.053
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dof	0
naifa/vnmrpy/data/~	dm	nny	0
/mar02/RMN019CP2.f~	dm	c	
id	id	dpwr	51
ACQUISITION		crossp	2500
efrq	75.433	dipolr	8900
tn	C13	DIGITAL FILTERS	
tof	0	dsp	n
at	0.050560	oversamp	1
np	10112	PROCESSING	
sw	100000.0	lb	100.00
fb	55000	st	0.003
xpol	y	stf	not used
tpwr	51	phfid	-0.8
tpwr	4085	wtfile	
pw	4.5	proc	ft
cntct	5000.0	fn	32768
d1	2.000	math	?
nt	12000	warr	
ct	12000	wexp	
ss	4	wss	
gain	50	wnt	
rof1	10.0	DISPLAY	
rof2	10.0	sp	-1508.0
alfa	0.6	vp	26338.2
FLAGS		vs	88548
il	n	sc	0
in	n	wc	240
dp	y	h2mm	84.74
xpol	y	ls	26257.80
toss	n	rfl	48355.8
pdp	n	rfp	1304.8
SPECIAL		th	10
pad	2.0	ins	10.000
epin	5504	al	
erate	2500		
temp	not used		



exp10 xpolar1

nt 12000 wv
 ct 12000 wtemp
 bs 4 wbs
 es 4 wnt
 gain 50
 ror1 10.0 sp
 ror2 10.0 wp
 alfa 0.6 vs
 FLAOS n sc
 i1 n wc
 in n h2mm
 dp y is
 xpo1 y rf1
 toss n rfp
 pdp n th
 SPECIAL n ins
 pad 2.0 al
 spin 5501 ph
 state 2500
 temp not used

DISPLAY
 -1552.9
 20383.1
 88848
 0
 240
 84.87
 28257.80
 49835.8
 1304.8
 10
 18.000

174.420
 147.510
 130.354
 55.740
 32.433

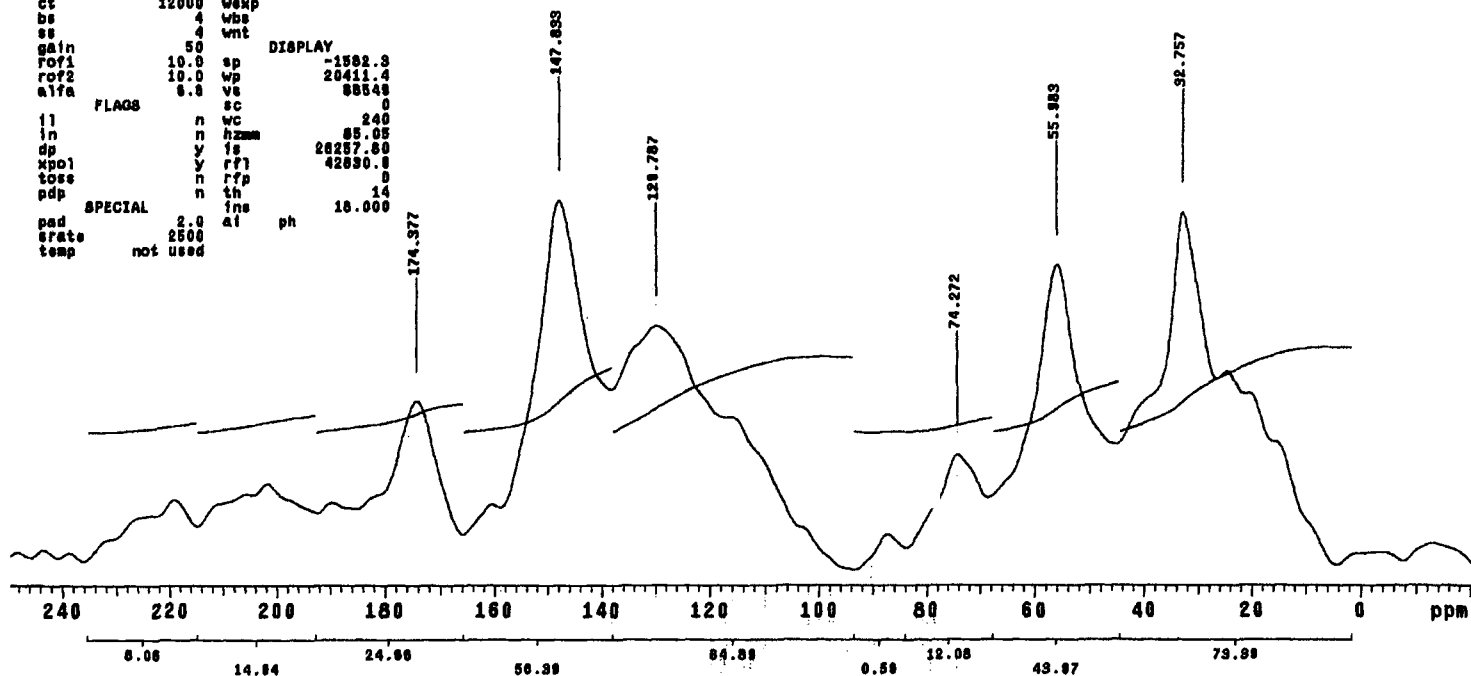
240 220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm

0.06 21.00 20.85 57.86 71.82 10.55 84.38 15.80 82.81

HA A4
 13C CPAS D1-28 CNTCT-5000 NT-12000
 PROBE VARIAN 7MM VT VEL-5500HZ
 RHN018-4/02

exp10 xpolar1

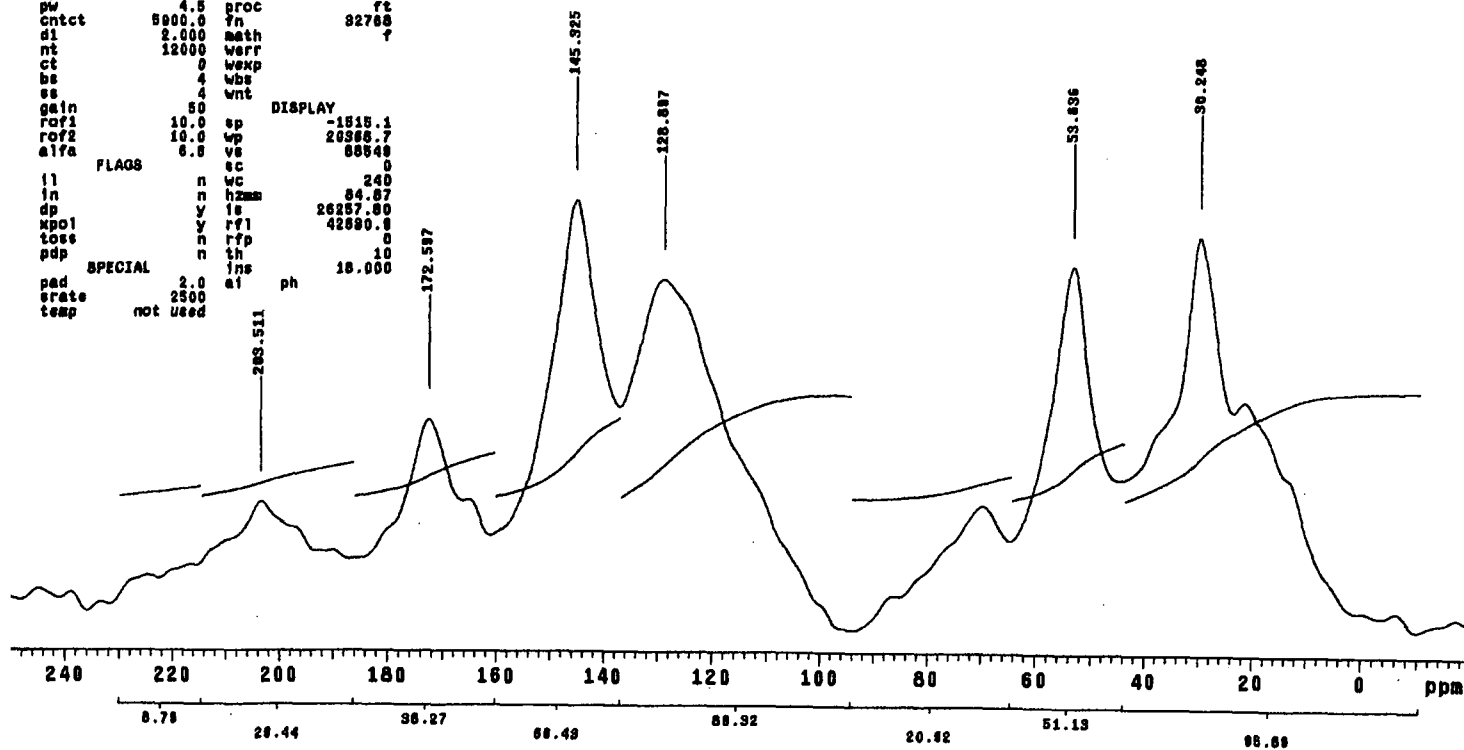
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 18 2002	dfrq	255.969
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dof	0
naire	/vnmrsv/data~	dm	nny
/mar02/RHN018CP4.f~		dmm	c
	id	dpwr	61
ACQUISITION		PROCESSING	
sfrq	75.489	crossp	2600
tn	C13	dipolr	3600
tof	0	DIGITAL FILTERS	n
at	0.050580	oversamp	1
np	10112	lb	100.00
sw	100000.0	gf	0.003
fb	55000	gfs	not used
xpol	y	phfid	-0.9
tpwr	55	wtfile	
tpwrn	4085	proc	ft
pw	4.5	fn	32768
cntct	5000.0	math	?
d1	2.000	warr	
nt	12000	wexp	
ct	12000	wbs	
bs	4	wnt	
ss	4		
gain	50	DISPLAY	
rof1	10.0	sp	-1582.3
rof2	10.0	wp	20411.4
a1fa	6.3	vs	88548
FLAGS		sc	0
l1	n	wc	240
in	n	hzm	85.05
dp	y	ls	26257.80
xpol	y	rf1	42830.8
tozs	n	rff	0
pdp	n	th	16
SPECIAL		ins	18.000
pad	2.0	ph	
erate	2500		
temp	not used		



AM A5
 13C CPNMR D1-28 CNTCT-5000 NT-12000
 PROBE VARIAN VT 7MM VEL-5500HZ
 RMN018-5/02

exp10 xpolari

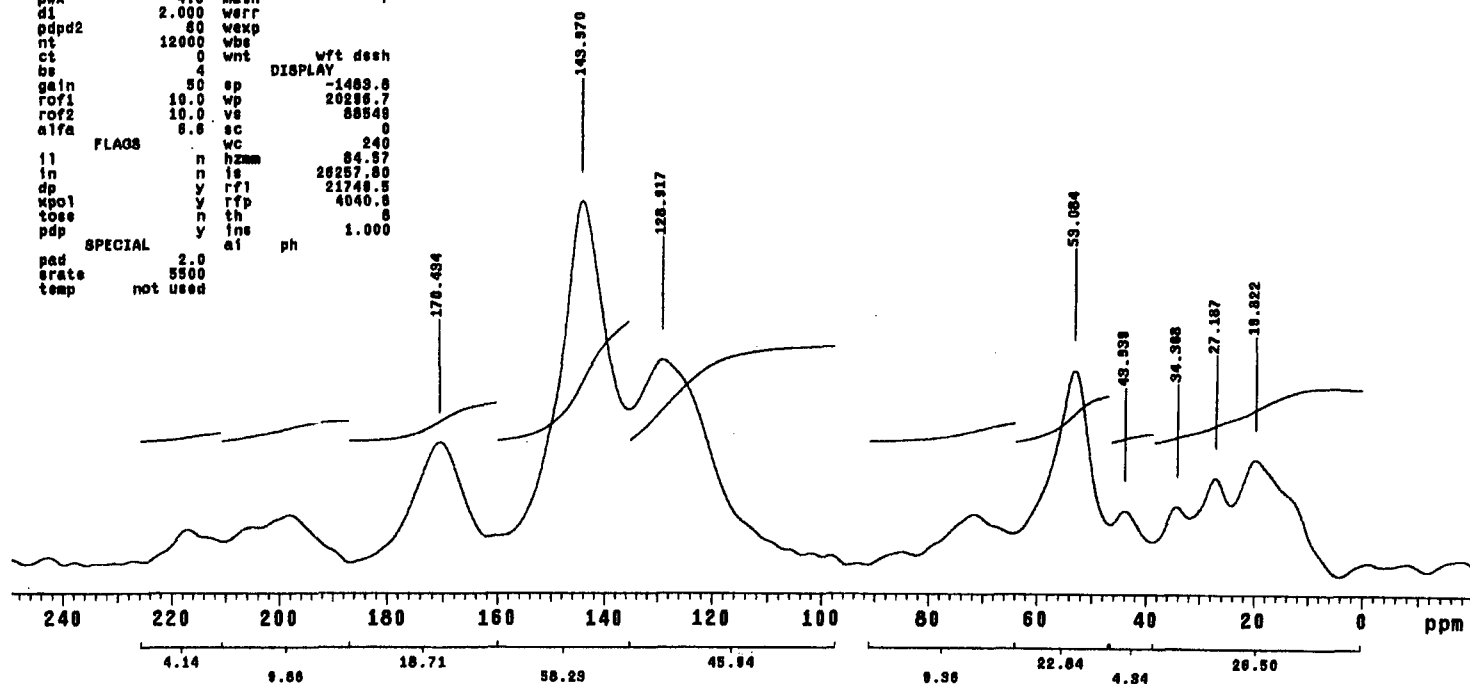
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 16 2002	dfrq	200.883
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dof	0
name	/vnmrpy/data/~	dm	nny
file	/mar02/RMN018CPS.f~	dmm	C
ACQUISITION		id	dpwr
efrq	75.433	crossp	2800
tn	C13	dipolr	8800
tof	0	DIGITAL FILTERS	
st	0.050500	dep	n
np	18112	oversamp	1
sw	100000.0	PROCESSING	
fb	88000	lb	100.00
xpol	y	gf	0.003
tpwr	53	gfe	not used
tpwr	4083	phfid	-0.8
pw	4.5	wtfile	
cntct	5000.0	proc	rt
d1	2.000	fn	32788
nt	12000	math	f
ct	0	warr	
bs	4	wexp	
ss	4	wba	
gain	50	wnt	
rof1	10.0	DISPLAY	
rof2	10.0	sp	-1815.1
alfa	6.0	wp	20386.7
FLAGS		vs	88548
il	n	sc	0
in	n	wc	240
dp	y	h2m	84.87
xpol	y	ls	26257.80
loss	n	rf1	42890.8
pdp	n	rfp	0
SPECIAL		th	10
pad	2.0	ins	18.000
erate	2500	ai	ph
temp	not used		



AH A0
 13C CPNMR-PDP D2-60US D1-28 CNTCT-5000 M
 T-12000
 PROBE VARIAN VT 7MM VEL-5500HZ
 RNN018-S/02

exp8 npolar1

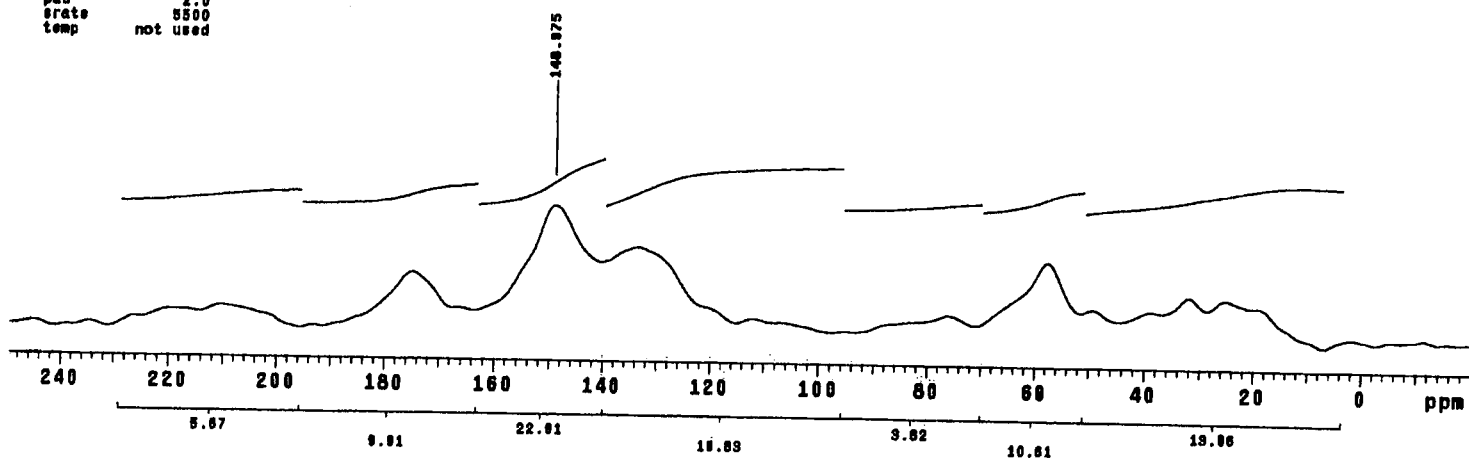
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 15 2002	dfrq	299.969
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~ dot		0
naifa/vnmrsvs/data/~	dm	nny	
/mar02/RNN01808.f1~	dmm	ccc	
	d	dpwr	81
ACQUISITION		PROCESSING	
sfrq	75.439	crossp	2500
tn	C13	dipolr	4085
tof	0	dsp	n
at	0.030980	oversamp	1
np	8056		
sw	50000.0	lb	100.00
fb	28000	gf	0.003
xpol	y	qfs	not used
tpwr	4085	wtfile	1
pw	4.6	proc	ft
cntct	5000.0	fn	18364
pmx	4.6	math	f
d1	2.000	werr	
pdpd2	80	wexp	
nt	12000	wbs	
ct	0	wnt	
bs	4	wft desh	
gain	50	sp	-1489.8
rofl	10.0	wp	20257.7
rofl2	10.0	vs	88549
alfa	8.6	sc	0
	FLAGS	wc	240
l1	n	hzmm	84.67
in	n	is	20257.80
dp	y	rfl	21748.5
xpol	y	rfp	4040.8
toes	n	th	8
pdp	y	ins	1.000
	SPECIAL	ai	ph
pad	2.0		
srats	5500		
temp	not used		



HA A1
 13C CPMA5-PDP D2-60US D1-28
 PROBE VARIAN 7MM VT VEL-5500HZ
 RNN019-1/02

exp9 xpolari

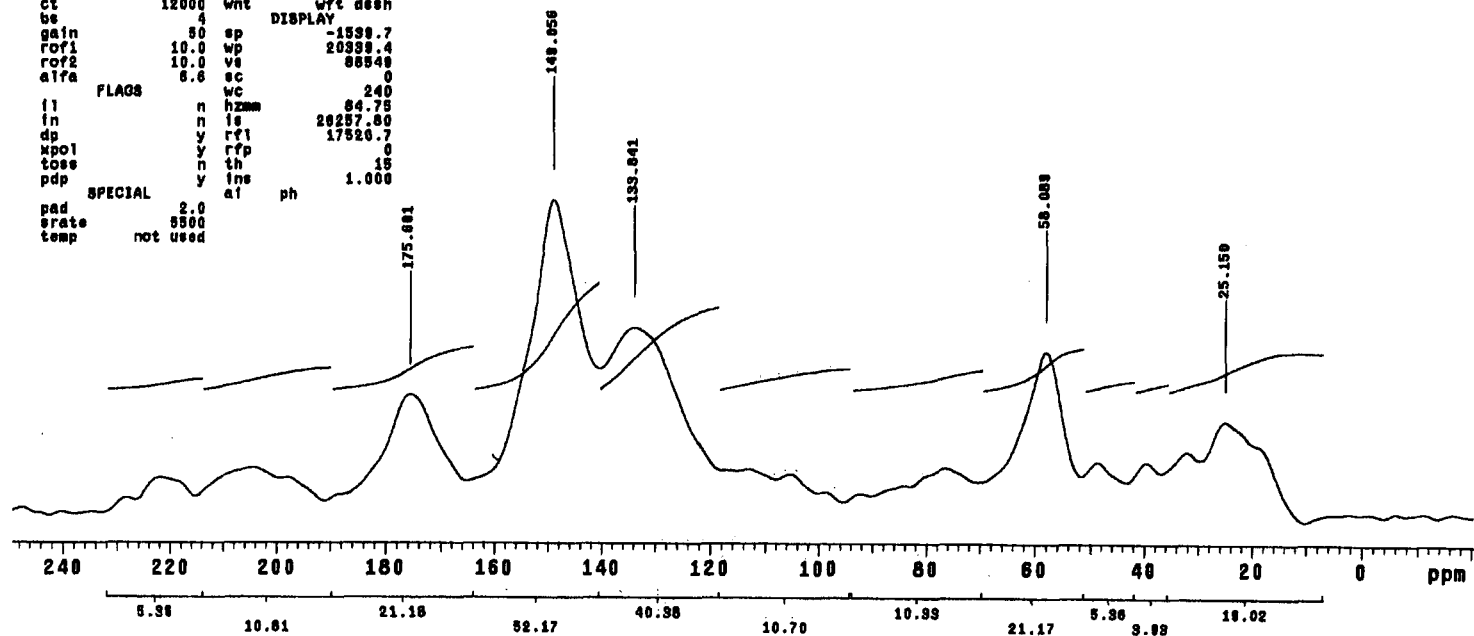
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 8 2002	dfrq	299.868
solvent	nons	dn	H1
file	/export/home/-	dof	0
naira/vnmrsvc/data-		dm	nny
/mar02/RNN018D1.f -		dmm	ccc
		d	61
		dpwr	2500
ACQUISITION		DIGITAL FILTERS	
sfrq	75.438	dipolr	4088
tn	C19	dsp	n
tof	0	oversamp	1
at	0.080580	PROCESSING	
np	5056	lb	200.00
sw	50000.0	gf	0.004
fb	28000	y	not used
xpol	y	lefid	1
tpwr	50	wtfile	
tpwrm	4088	proc	ft
pw	4.8	fn	16384
cnict	5000.0	math	f
pwk	4.8	warr	
d1	2.000	wexp	
pdpd2	80	wbe	
nt	12000	wnt	
ct	12000	wft dech	
ss	4	DISPLAY	
gain	50	sp	-1529.8
rof1	10.0	wp	20351.6
rof2	10.0	vs	88548
alfa	6.6	sc	0
FLAGS		wc	240
l1	n	hzmm	84.80
in	n	ls	28257.80
dp	y	rfl	17520.7
xpol	y	rfp	0
toss	n	th	15
pdp	y	ins	1.000
SPECIAL		ai	ph
pad	2.0		
srata	5500		
temp	not used		



HA A2
 13C CPNAB-PDP D2-60US CNTCT=5000 D1=28 N
 T=12000
 PROBE VARIAN 7MM VT VEL=5500HZ
 RNN019-2/02

exp8 xpolar1

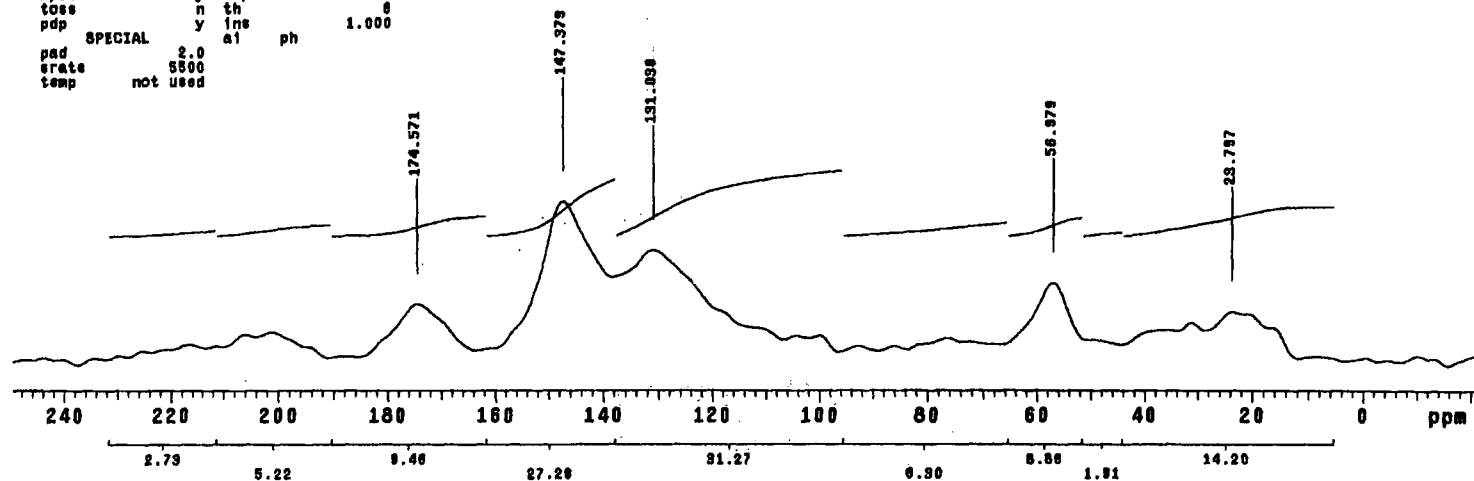
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 11 2002	dfrq	238.863
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dof	0
naire/vmrays/data/~	dm	nny	
/mar02/RNN019D2.f1~	dmm	ccc	
	d	dpwr	61
ACQUISITION		PROCESSING	
sfrq	75.433	crossp	2500
tn	019	dipolr	4095
tof	0	DIGITAL FILTERS	
at	0.050560	dsp	n
np	5056	oversamp	1
sw	50000.0	lb	100.00
fb	28000	gf	0.003
xpol	y	gfe	not used
tpwr	58	isfid	1
tpwrn	4095	wtrile	
pw	4.6	proc	ft
cntct	5000.0	fn	18384
pwk	4.6	math	f
d1	2.000	warr	
pdpd2	80	wexp	
nt	12000	wbs	
ct	12000	wnt	
bs	4	wrt	deah
gain	50	sp	-1539.7
rof1	10.0	wp	20338.4
rof2	10.0	vs	88548
alfa	6.6	sc	0
FLAGS		wc	240
il	n	hzm	84.75
in	n	ls	29257.80
dp	y	rfl	17520.7
xpol	y	rff	0
tose	n	th	15
pdp	y	ins	1.000
SPECIAL		ai	ph
pad	2.0		
state	5500		
temp	not used		



HA AS
 13C CPNMR-PDP D2-80US CNTCT=5000 D1-28 N
 T=12000
 PROBE VARIAM 7MM VT VEL=5500HZ
 RMN010-3/02

exp# xpolar1

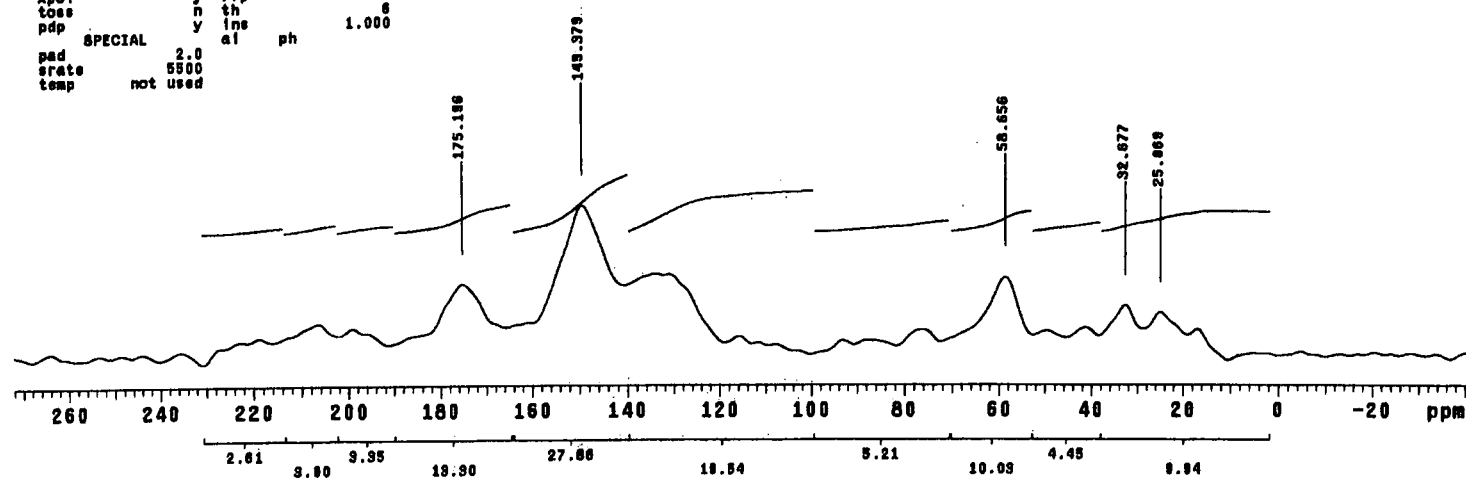
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 12 2002	dfrq	200.983
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dof	0
name	/vnmr/sv/data/~	dm	nny
name2	/RMN010S.f1~	dmm	ccc
		d	61
ACQUISITION		crossp	2500
efrq	75.433	dipolr	4095
in	C13	DIGITAL FILTERS	
tof	0	dep	n
at	0.050560	oversamp	1
np	5056	PROCESSING	
sw	50000.0	lb	100.00
fb	25000	gf	0.003
xpol	y	gfs	not used
tpwr	5	lefid	1
tpwr	4095	wtfile	
pw	4.8	proc	ft
cntct	5000.0	fn	18904
pmx	4.8	math	f
d1	2.000	werr	
pdpd2	60	wexp	
nt	12000	wbs	
ct	12000	wnt	
bs	4	wft dech	
gain	50	sp	-1850.2
rofl	10.0	wp	20388.2
rof2	10.0	vs	85548
alfa	8.8	sc	0
FLAGS		wc	240
i1	n	h2mm	84.85
in	n	is	28257.80
dp	y	rfl	28712.2
xpol	y	rfp	11120.0
toss	n	th	0
pdp	y	ins	1.000
SPECIAL		al	ph
pad	2.0		
erate	5500		
temp	not used		



HA A4
 13C CPNAB-PDP D2-80US D1-28 CNTCT-5000 N
 T=12000
 PROBE VARIAN 7MM VT VEL=5500HZ
 RHN018-4/02

exp8 xpolar1

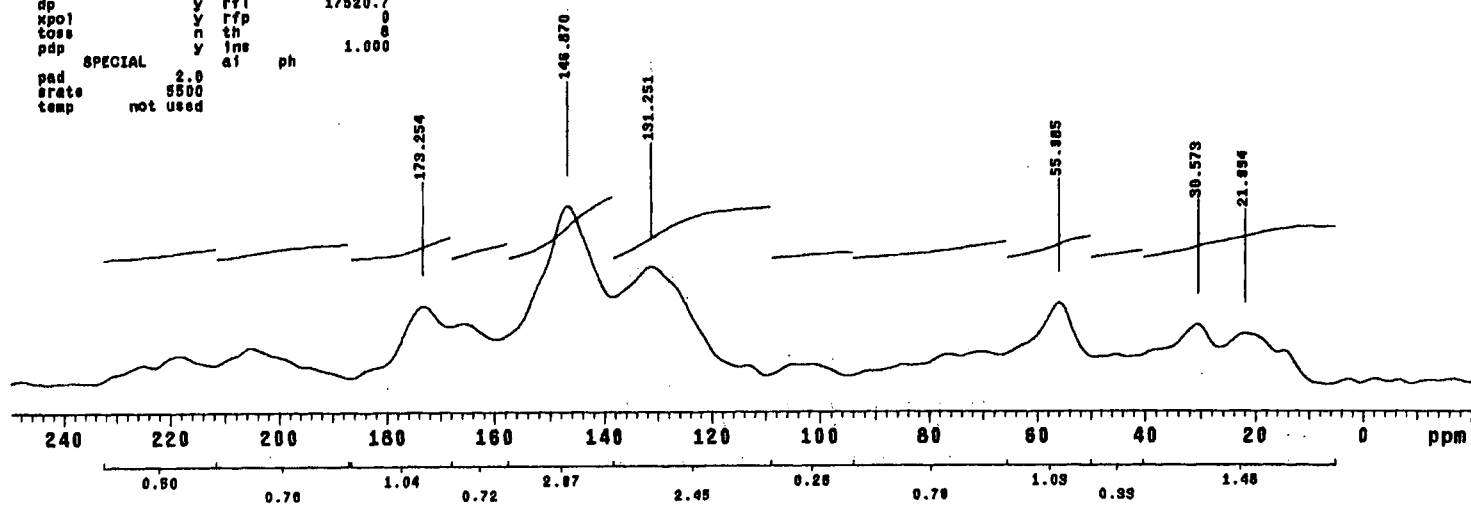
SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 19 2002	dfrq	200.863
solvent	none	dn	M1
file	/export/home/~	dof	0
naire/vnmrpy/data/~		dm	nny
/mar02/RHN018D4.f1~		dmm	ccc
		d	51
ACQUISITION			
efrq	75.493	ctoss	2500
tn	C13	dipolr	4085
tof	0	dsp	n
at	0.050580	oversamp	1
np	5656	PROCESSING	
sw	50000.0	lb	100.00
fb	28000	gf	0.003
xpol	y	gfs	not used
tpwr	50	lef1d	1
tpwrn	4085	wf1le	
pw	4.8	proc	ft
cntct	5000.0	fn	18364
pwm	4.8	math	f
d1	2.000	werr	
pdpd2	80	wexp	
nt	12000	wbs	
ct	12000	wnt	
bs	4	wft desh	
gain	50	DISPLAY	
rof1	10.0	sp	-3132.9
rof2	10.0	wp	23847.9
alfa	6.8	vs	88549
		sc	0
		wc	240
FLAGS		hzm	99.83
il	n	ls	26257.80
in	n	rf1	17520.7
dp	y	rfp	0
xpol	y	th	6
toes	n	ins	1.000
pdp	y	al	ph
SPECIAL			
pad	2.0		
erate	5500		
temp	not used		



AH A5
 18C CPNAB-PDP 02-80US D1-28 CNTCT-5000 N
 T-12000
 PROBE VARIAN VT 7MM VEL-5500MHZ
 RHN018-5/02

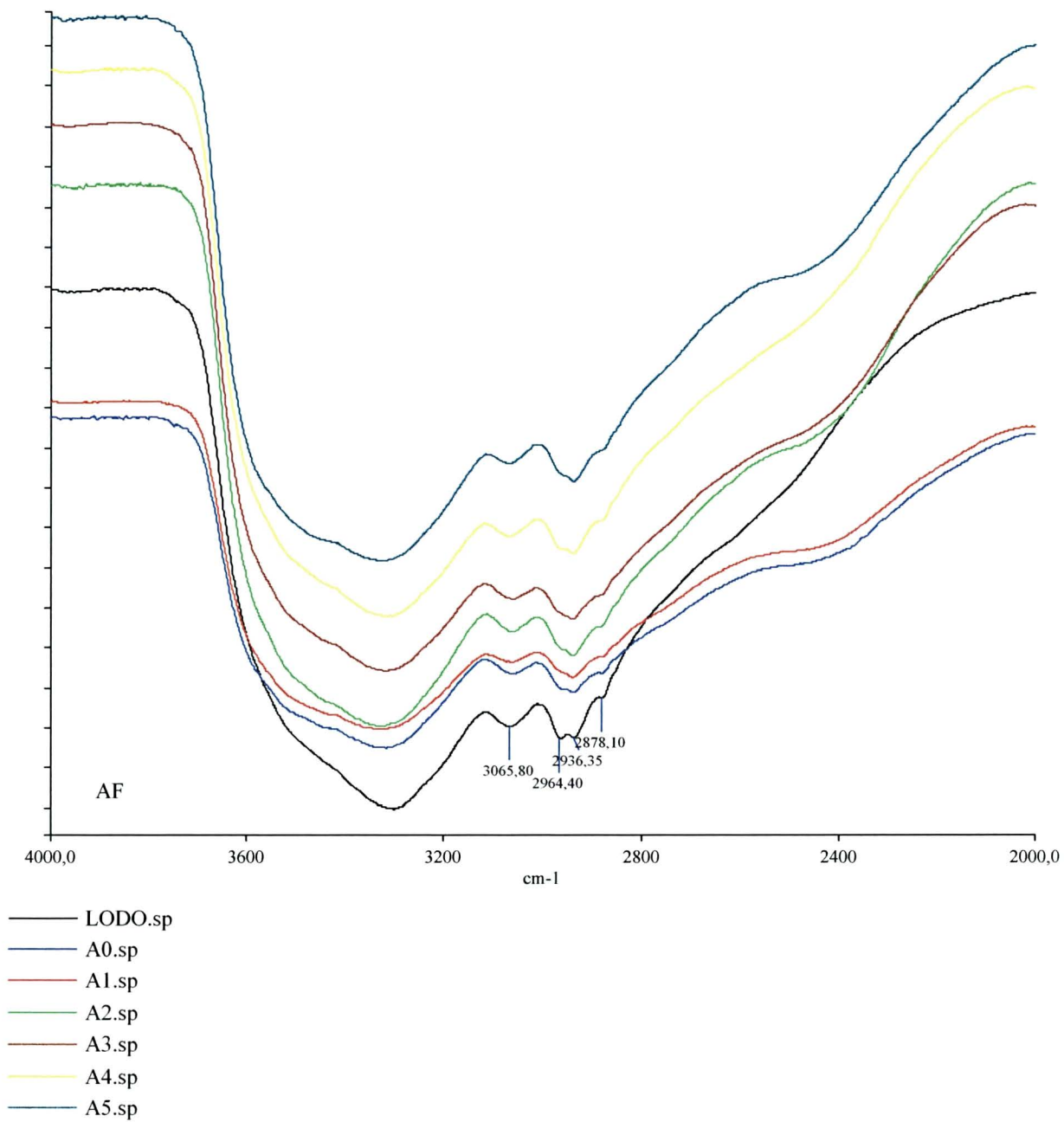
exp8 xpolar1

SAMPLE		DECOUPLING	
date	Mar 16 2002	dfrq	200.869
solvent	none	dn	H1
file	/export/home/~	dot	0
naiba/vnmrpye/data/~	dm	nny	
/mar02/RHN01805.f1~	dmm	ccc	
d	d	dpwr	61
ACQUISITION		crossp	2500
sfrq	75.433	dipolr	4085
in	C13	DIGITAL FILTERS	
tof	0	dsp	n
at	0.050560	oversamp	1
np	5058	PROCESSING	
sw	50000.0	lb	100.00
fb	26000	gf	0.003
xpol	y	gft	not used
tpwr	59	lefld	1
tpwrm	4085	wfile	
pw	4.6	proc	ft
cntct	5000.0	fn	18984
pwk	4.6	math	f
d1	2.000	werr	
pdpd2	60	wexp	
nt	12000	wbs	
ct	0	wnt	wft dsh
bs	4	DISPLAY	
gain	50	sp	-1538.7
rof1	10.0	wp	20388.2
rof2	10.0	vs	88548
alfa	6.6	ec	0
FLAGS		wc	240
il	n	h2mm	54.85
in	n	ie	26257.80
dp	y	rfl	17520.7
xpol	y	rfp	0
cosc	n	th	0
pdp	y	ins	1.000
SPECIAL		ai	ph
pad	2.0		
state	5500		
temp	not used		

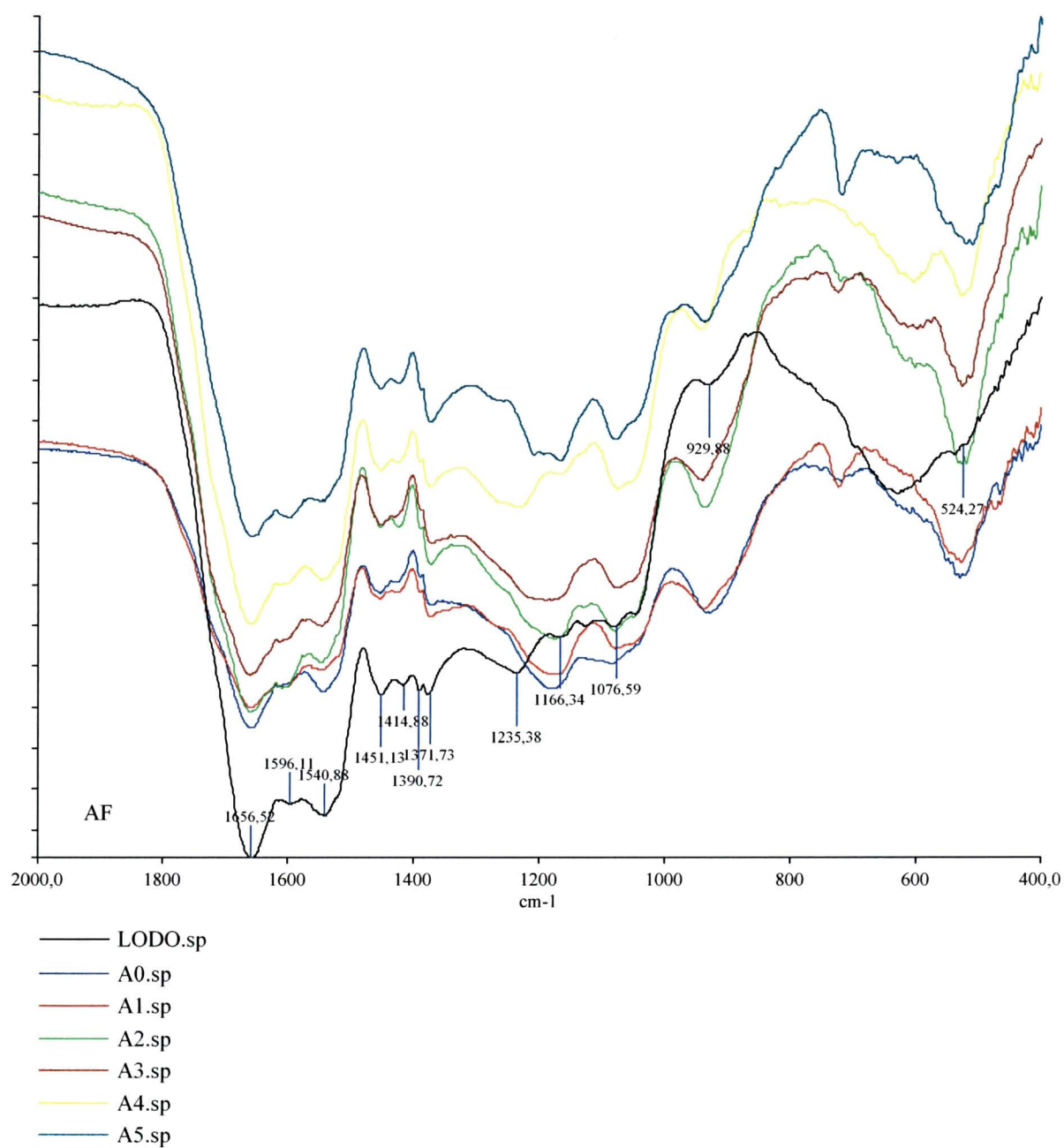


ANEXO II

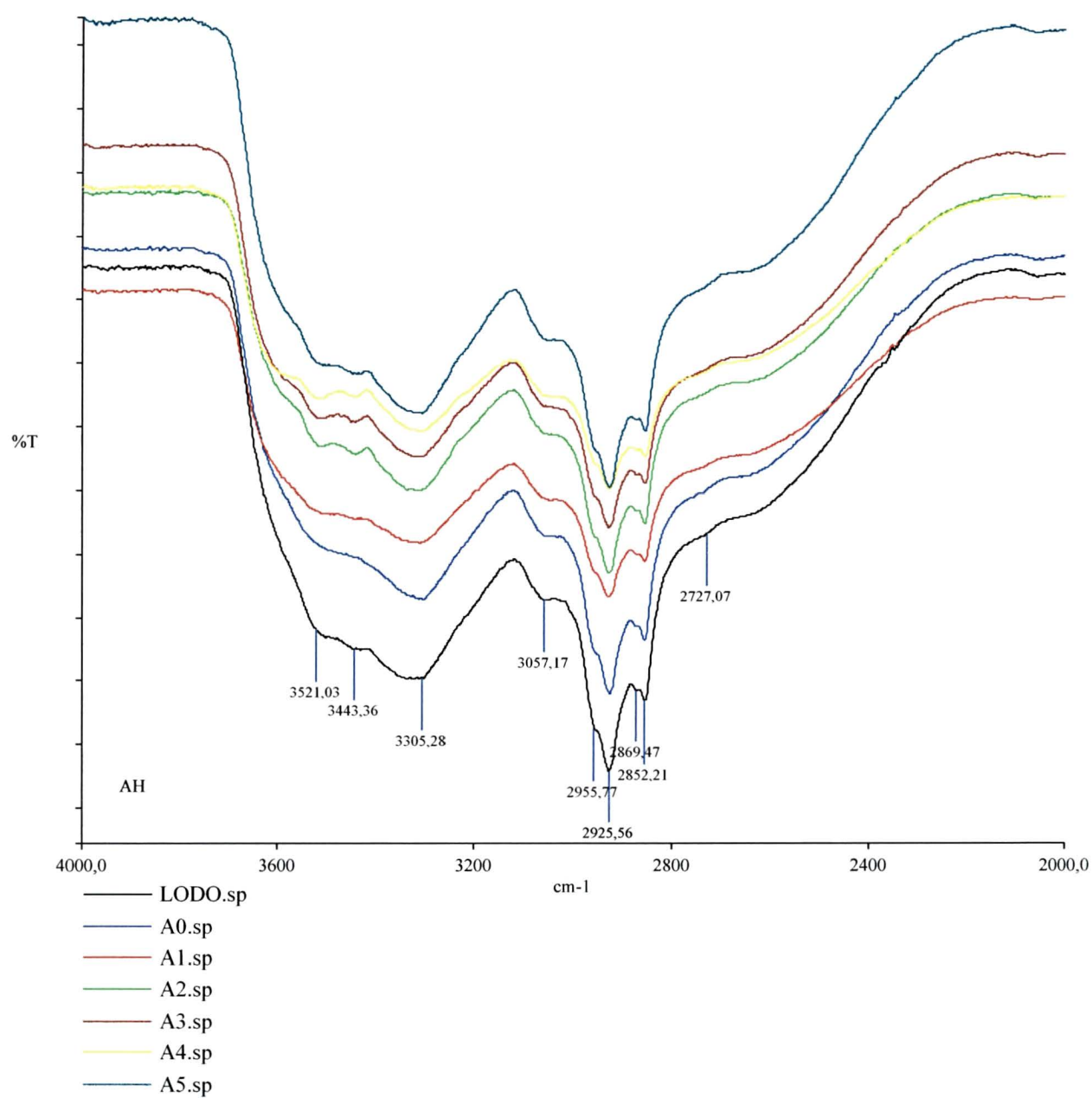
ESPECTROS DE INFRAVERMELHO EXPANDIDOS



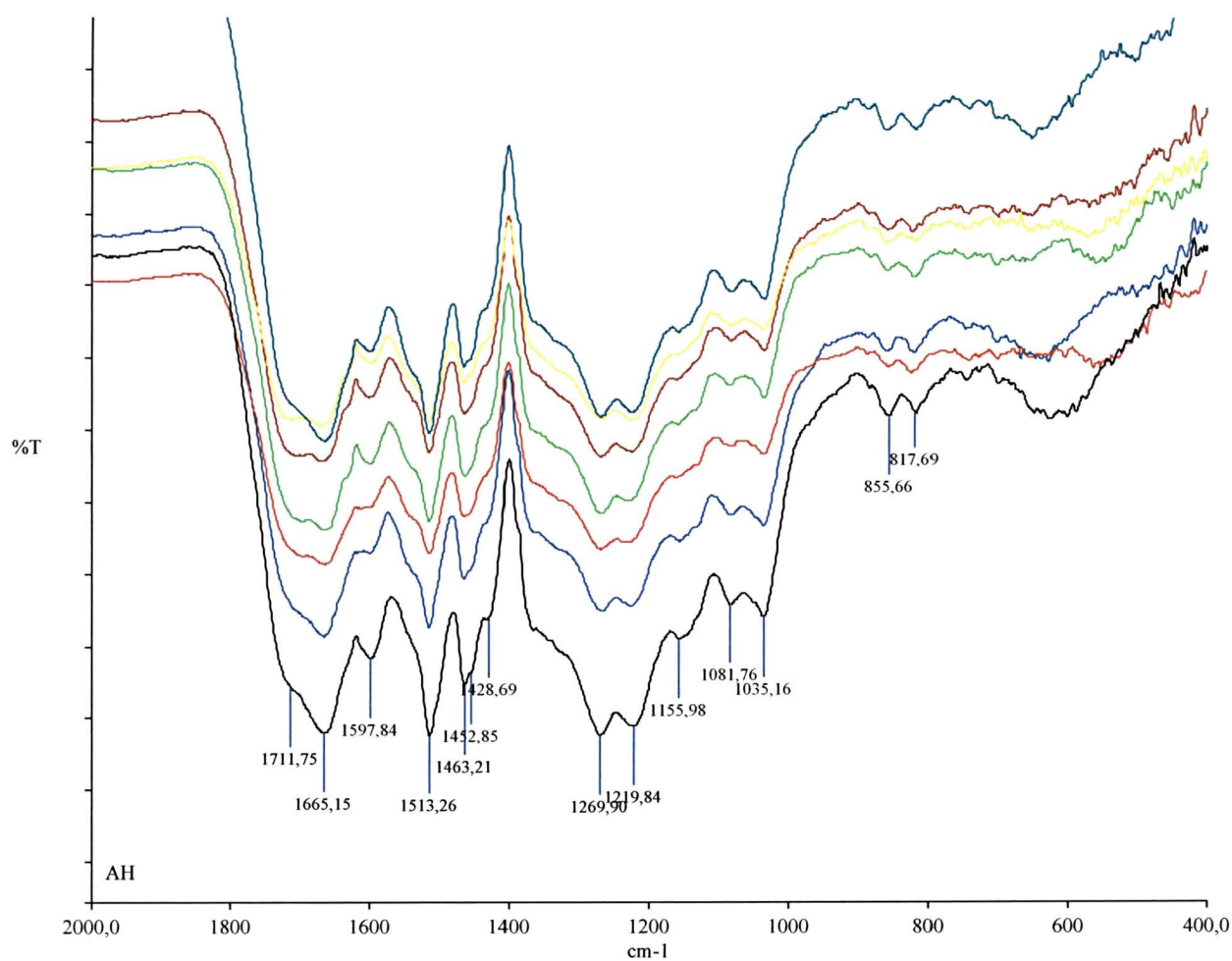
ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA-DRIFT (EXPANSÃO 4000-2000) DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE COMPOSTO SERRAGEM-LODO.



ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA-DRIFT (EXPANSÃO 2000-400) DE ÁCIDOS FÚLVICOS OBTIDOS DE COMPOSTO SERRAGEM-LODO.

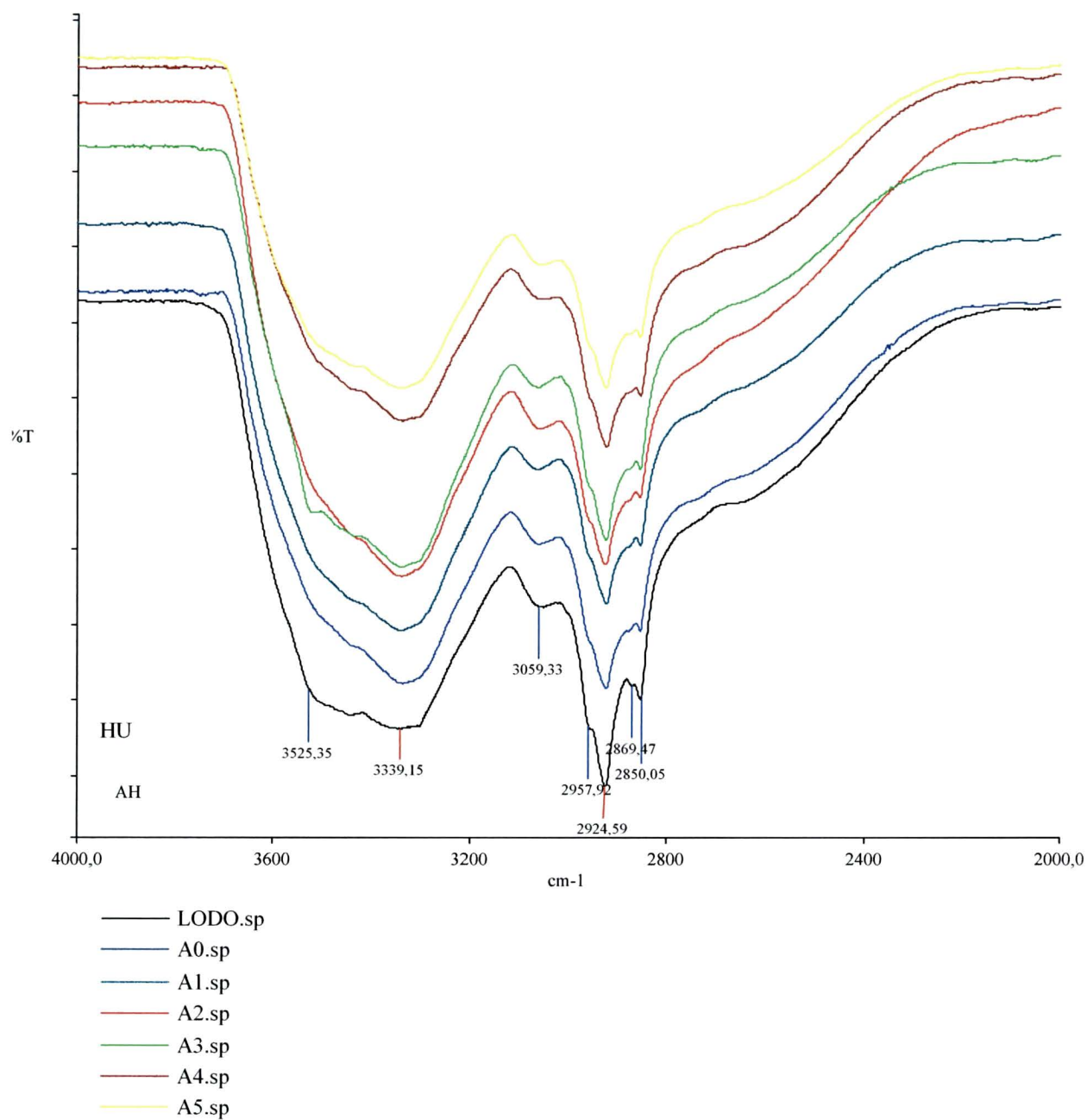


ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA-DRIFT (EXPANSÃO 4000-2000) DE ÁCIDOS HÚMICOS OBTIDOS DE COMPOSTO SERRAGEM-LODO.

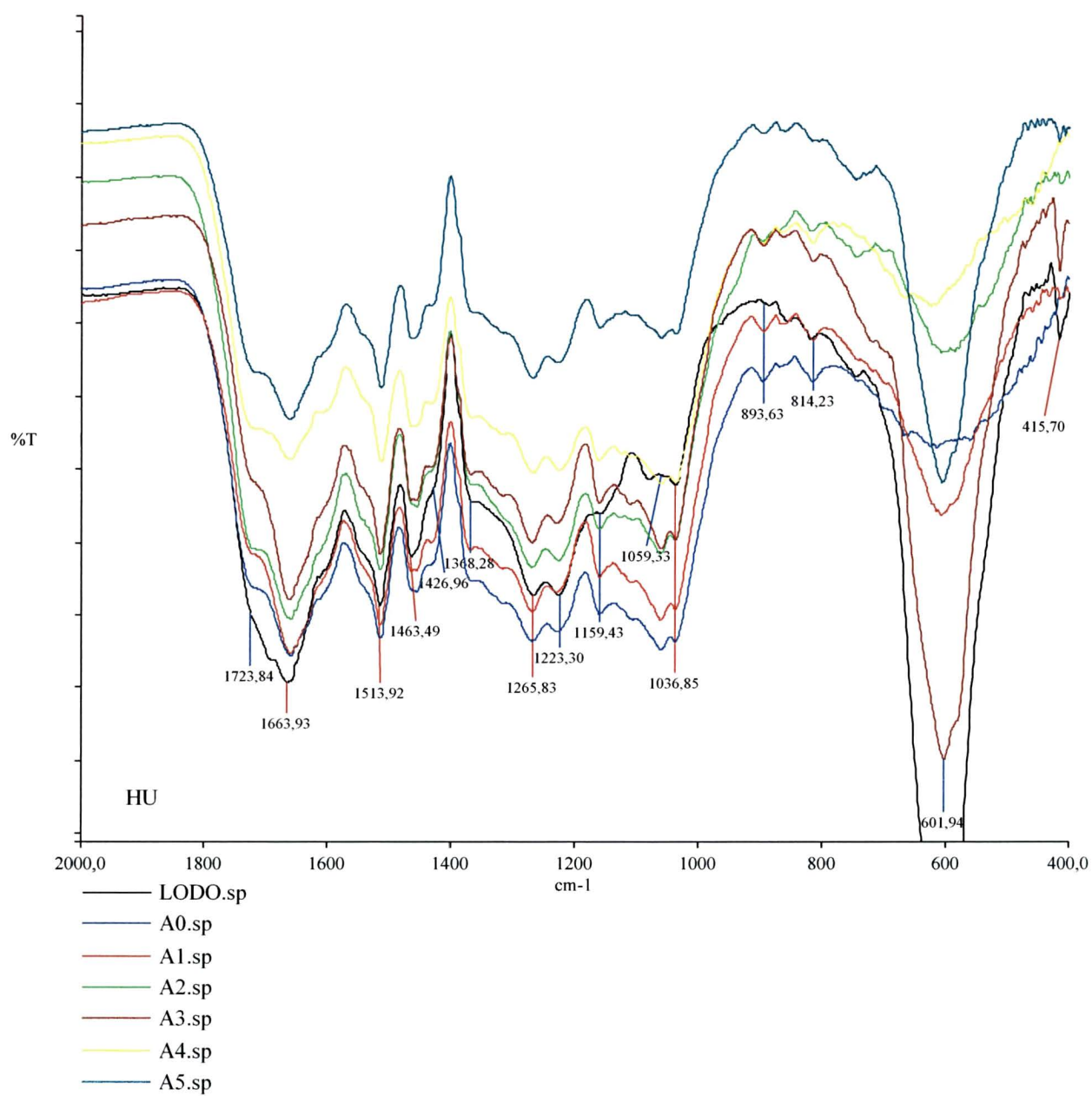


— LODO.sp
 — A0.sp
 — A1.sp
 — A2.sp
 — A3.sp
 — A4.sp
 — A5.sp

ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA-DRIFT (EXPANSÃO 2000-400) DE ÁCIDOS HÚMICOS OBTIDOS DE COMPOSTO SERRAGEM-LODO.



ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA-DRIFT (EXPANSÃO 4000-2000) DE HUMINA OBTIDAS DE COMPOSTO SERRAGEM-LODO.



ESPECTROS DE INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA-DRIFT (EXPANSÃO 2000-400) DE HUMINA OBTIDAS DE COMPOSTO SERRAGEM-LODO.

ANEXO III

ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO

Claudia M. B. F. Maia^a,
Fábio Simonelli^b,
Antonio S. Mangrich^b

^a Embrapa, CP 319,
Colombo/PR, 83411-000, Brazil
^b Dep. Química,
Universidade Federal do
Paraná,
Curitiba, CP 19081,
81531-970, Brazil

Spectroscopic Characterization of Organic Structures and Organic-Inorganic Interactions in Paper Mill Sludge

The organic composition and organic-inorganic interaction in paper mill sludge (PS) solvent extracts (hexane, ethyl acetate, acetone and ethanol) and humic fractions, humic acid (HA) and humin (HU) were studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR), proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR; ¹³C NMR), Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR), and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis). The strategy of fractionating the PS, sequentially, with organic solvents of increasing polarity is a reliable analytical procedure for humic substance sample separation because it results in more purified fractions. FTIR, ¹H NMR and ¹³C NMR results showed that hexane extract consisted mainly of aliphatic hydrocarbon structures. Their contents in the extracts decreased as the polarity of the extracting solvent increased and the content of oxygen functional groups increased. Carboxylic and carboxylate functional groups were found in the acetone extract, and ester and ether functions were predominantly found in the ethanol extract. EPR spectra revealed some Fe³⁺ complexes with rhombic structure ($g_1 = 4.3$; $g_2 = 9.0$) in the humic fractions and in all solvent extracts, except hexane. Quasi-octahedral Fe³⁺ complexes ($g = 2.3$; $\Delta H_{pp} \leq 400$ G) were found in the HU fraction and in the acetone extract. The organic free radical content in the HA fraction was higher than the non-fractionated PS sample and HU fraction.

Spektroskopische Charakterisierung von organischen Strukturen und den Wechselwirkungen zwischen organischer Substanz und Metallen in einem Rückstand der Papierherstellung

An Lösungsmittelextrakten (Hexan, Ethylacetat, Aceton und Ethanol) und den Huminstofffraktionen Huminsäure (HA) und Humin (HU) eines Rückstandes aus der Papierherstellung (PS) wurden Untersuchungen zur Zusammensetzung der organischen Substanz und zu den Wechselwirkungen zwischen organischer Substanz und Metallen durchgeführt. Eingesetzt wurden dabei die Elektronen-paramagnetische Resonanzspektroskopie (EPR), die Protonen- und die ¹³C-Kernresonanzspektroskopie (¹H-NMR, ¹³C-NMR), die Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) und die optische Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV-vis). Die sequentielle Extraktion des PS mit Lösungsmitteln steigender Polarität erwies sich als geeignete Methode, zu Fraktionen höherer Reinheit zu gelangen. Aus den FTIR-, ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Messungen geht hervor, dass im Hexanextrakt hauptsächlich aliphatische Kohlenwasserstoffstrukturen zu finden sind. Der Gehalt dieser Strukturen nimmt mit steigender Lösungsmittelpolarität und mit steigendem Anteil an sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen ab. Carboxyl- und Carboxylatgruppen finden sich hauptsächlich im Acetonextrakt, Ester- und Ether-Funktionen im Ethanolextrakt. EPR-Spektren deuten auf Fe³⁺-Komplexe mit rhombischer Struktur ($g_1 = 4.3$; $g_2 = 9.0$) in den Huminstofffraktionen und in allen Lösungsmittelextrakten außer dem Hexanextrakt hin. Nur in der Huminfraction und im Acetonextrakt liegen Fe³⁺-Komplexe mit quasi-oktaedrischer Struktur vor ($g = 2.3$; $\Delta H_{pp} \leq 400$ G). Der Gehalt an organischen freien Radikalen war in der HA-Fraktion höher als in der nicht fraktionierten PS-Probe und in der HU-Fraktion.

Keywords: Humic Substances, Humic Acid, Humin, Extraction, EPR, ¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR, IR, UV-vis Spectroscopy

Schlagwörter: Huminstoffe, Huminsäure, Humin, Extraktion, EPR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FTIR, IR, UV-vis-Spektroskopie

Correspondence: A. S. Mangrich, E-mail: mangrich@quimica.ufpr.br

1 Introduction

Use of composted or non-composted industrial organic wastes for soil amendments is a common procedure worldwide. Economically viable and environmentally acceptable technologies for recycling organic wastes are under continuous research. Paper mill sludge (PS) is a by-product of the paper making industry [1–3] and composting of this waste in Brazil is accounted as the most environmentally acceptable technology to convert it into useful organic fertilizer. In order to activate the waste sludge through microbiological processes, some phosphorus and nitrogen nutrients are added to the PS while in the paper mill. Therefore, C, N, and P contents in this material are close to the levels required for the composting process. Although PS is a complex mixture of organic and inorganic compounds, its constitution does not vary much, since the industrial process is more or less perennial.

^1H and ^{13}C NMR spectroscopy for humic substances (HS) in solution has been scarcely studied because, in general, the spectra show broad signals, probably due to presence of polymeric material which makes elucidation of simple structures difficult. The approach here is the analysis of less complex samples and the integration among the EPR, FTIR, UV-vis and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy data.

In order to layout and conduct the composting process, it is necessary to know the composition of the raw material. We are working on a project to develop a methodology to characterize PS from paper and cellulose industries in the State of Paraná (southern Brazil). This methodology will be useful, also, to monitor changes in the material during the composting process [4]. In the first part of the work we analyzed the sequential Soxhlet organic solvent extracts and humic fractions of the PS supplied by "Iguaçu Celulose e Papel" company.

2 Material and methods

Oven-dry (60 °C) PS was powdered and sieved through a 2 mm mesh. A sample of approximately 90 g of the material was placed in a Soxhlet thimble with 500 mL of p.a. hexane (Merck). The extraction of apolar components was considered complete when the solvent became colorless. Further extractions followed by adding, sequentially, 500 mL of p.a. ethyl acetate (Merck), 500 mL of p.a. acetone (Merck) and 500 mL of p.a. ethanol (Merck). Samples of extracts from each step were obtained by vacuum drying. HA was extracted from the solid residue through alkaline dissolution and acid precipitation, only once, in order to prevent loss or modification of important constituents.

Data on EPR spectra of extract frozen (77 K) solutions, and

ESP 300E spectrophotometer operating at a frequency of 9.7 GHz (X-band) was used, with a 100 kHz modulation frequency, 2.024 G modulation amplitude and ca. 20 mW microwave power. EPR spectra were simulated by using Win-EPR® and SimFonia® Bruker softwares. PS, HU, and HA organic free radicals were quantified by using the intensity \times square line width approximation [5]. The areas of the EPR peaks were calibrated with a corresponding "strong pitch" standard signal of a known free radical content obtained from Bruker [5]. The same standard pattern ($g = 2.0028$) was used to estimate accurate g -values of the samples. ^1H NMR spectra of the extract solutions at room temperature were recorded in an AC-80 Bruker spectrometer, and ^{13}C NMR spectra in an AC-400 Bruker model. Chemical shifts were recorded in ppm by using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. FTIR spectra were read by using KBr pellets (99 mg of spectrometry grade KBr per milligram of sample), and recorded in a Bomem FTIR MB 100 spectrophotometer. The UV-vis spectra were recorded in a Hewlett Packard 8452 diode array spectrophotometer. The solvent extracts were analyzed against each organic solvent as reference. HA sample was prepared by dissolution of 1 mg of HA in 10 mL of 0.05 mol L⁻¹ NaHCO₃ [6].

3 Results and discussion

3.1 Magnetic resonance spectroscopy (EPR and ^1H , ^{13}C NMR)

The g -values of organic free radical (OFR) ranged from 2.0022 (hexane extract) to 2.0042 (ethyl acetate extract) (Table 1). Except for the hexane extract, the OFR g -values are typical of free radical near heteroatom in organic structures, possibly *ortho*- and *para*-semiquinone structures. The spin/ g number of the solid sample increased in the order PS < HU < HA. The spin/ g value is related to the degree of humification of the humic substance (HS) [7]. *Ortho*- and *para*-semiquinone structures in HS were in equilibrium with *ortho*- and *para*-biphenol functional groups [7]. *Ortho*-biphenol groups are a proper ligand to form chelates with metal ions. EPR spectra of the PS (Fig. 1, insert a'), and HA samples (Fig. 1c) showed sextets of absorption lines of out sphere Mn²⁺ ion complex, $[\text{Mn}(\text{OH})_6]^{2+}$ -organic matter, with $g = 2.00$ and hyperfine interaction, $A = 82.2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, for both samples (Table 1). To better illustrate the PS sample Mn²⁺ lines sextet, the second derivative mode spectrum was obtained (Fig. 1, insert a'). This increased the resolution but decreased the signal to noise ratio (S/N). The magnitude of the EPR hyperfine A parameter was related to the degree of covalent bonding of Mn²⁺ ion in its complexes [8]. The A value of $82.2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ indicat-

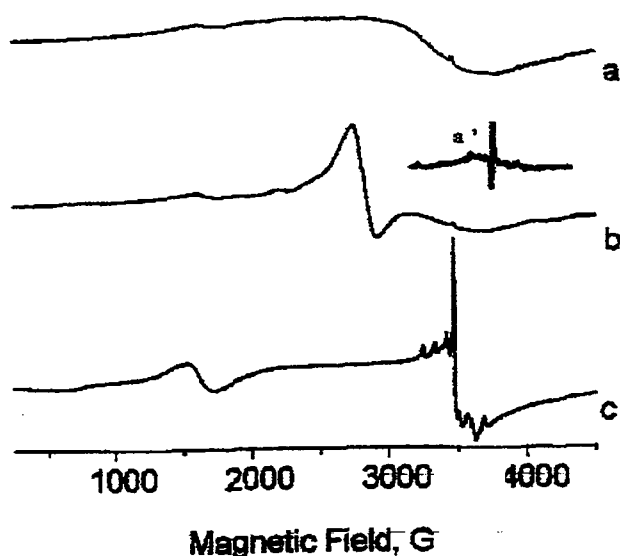


Fig. 1: EPR spectra of powder (a) PS, (b) HU, (c) HA samples (ca. 300 K) at 5000 G.

EPR-Spektren von pulverförmigen Proben (aufgenommen bei ca. 300 K) (a) eines Rückstandes aus der Papierherstellung, (b) der Huminfraction und (c) der Huminsäurefraction dieses Rückstandes bei 5000 G.

All samples, except the hexane extract (Figs. 1 and 2), showed evidences of high spin Fe^{3+} ($S = 5/2$) complexed in distorted octahedral and/or tetrahedral, rhombic coordination structures ($g_1 = 4.3$; $g_2 = 9.0$) [9].

The PS, HU, and acetone extract samples showed a wide absorption line centered at $g \approx 2$, with an "s" form (Table 1;

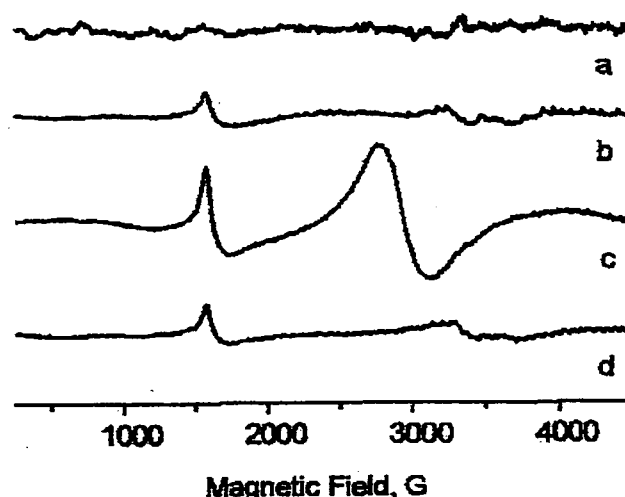


Fig. 2: EPR spectra of frozen (77 K) PS organic solvent extracts at 5000 G.

EPR-Spektren eingefrorener (77 K) organischer Extrakte eines Rückstandes aus der Papierherstellung bei 5000 G.

(a) hexane, (b) ethyl acetate, (c) acetone, (d) ethanol.

Fig. 1a, 1b and Fig. 2c). While the PS EPR spectrum yielded a broad absorption line with $g = 2.1$ and $\Delta H_{pp} = 915$ G, the HU and acetone extract spectra resulted in narrower lines centered at $g = 2.3$. These absorption patterns corresponded to the superimposed lines of the spin-spin coupling (dipolar interaction), proportional to r^3 , where r is the distance between

Table 1: EPR data of PS, HA, HU, and of frozen PS organic solvent extracts at a sweep range of 5000 G.

EPR-Daten von Proben eines Rückstandes aus der Papierherstellung (PS), der Huminfraction und der Huminsäurefraction sowie eingefrorener organischer Extrakte dieses Rückstandes für einen spektralen Bereich von 5000 G.

Sample	g			ΔH_{pp} (ln G) $g \approx 2.000$		A 10^{-4} cm^{-1}	Spin/g OFR
	Fe^{3+}	Mn^{2+}	OFR	Fe^{3+}	OFR		
Hexane extract	ND	ND	2.0022	ND	3.56	ND	ND
Ethyl acetate extract	4.3; 9.0	ND	2.0042	ND	6.86	ND	ND
Acetone extract	2.3; 4.3; 9.0	ND	2.0027	395	1.53	ND	ND
Ethanol extract	4.3; 9.0	ND	2.0037	ND	5.35	ND	ND
Humic Acid	4.3; 9.0	2.0	2.0034	ND	5.05	82.2	$5.7 \cdot 10^{15}$
Humin	2.3; 4.3; 9.0	ND	2.0034	177	7.41	ND	$2.6 \cdot 10^{15}$
PS	2.1; 4.3; 9.0	2.0	2.0037	915	6.82	82.2	$1.2 \cdot 10^{16}$

Table 2: ^1H and ^{13}C NMR spectra data of PS organic solvent extracts. ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten organischer Extrakte eines Rückstandes aus der Papierherstellung.

Assignment	^1H NMR chemical shifts, ppm			
	Hexane	Ethyl acetate	Acetone	Ethanol
Aromatic H	7.0...7.20	7.20...7.60	6.80...8.0	6.9...7.8
H-C(sp ²) not aromatic	5.1...5.3	5.2...5.6	5.3...5.9	5.1...5.4
H-C-X or H-CH ₂ -X (X=O,N)	ND	3.4...4.1	3.4...3.9	3.5...4.3
-CH ₂ -X, (X= -CONR ₂ , -COOR, -COR)	2.2...2.6	2.1...2.6	2.6	2.1...2.6
Aliphatic -CH ₂ -CH ₂ and -CH ₃	0.5...2.0	0.7...2.0	0.8...1.6	0.7...2.0

Assignment	^{13}C NMR chemical shifts, ppm			
	Hexane	Ethyl acetate	Acetone	Ethanol
-C=O acid; -C=O ester	ND	180	-	175
C aromatic	125...129	122...141	-	128...150
-C=C-	ND	ND	-	94...105
-C-X (X = O,N)	ND	71...72	-	71...79
-CH ₂ -X, (X= -CONR ₂ , -COOR, -COR)	43...47	43...57	-	62...67
Aliphatic -CH ₂ -CH ₂ - and -CH ₃	14...39	12...39	ND	10...39

ND: not detected

two of the magnetic dipoles [8]. The wide lines occurred due, also, to presence of paramagnetic metal ions that absorb in the same field region. Based on the EPR spectra and parameters obtained, it is suggested that these wide lines ($g = 2.3$) are due to Fe^{3+} ions in high concentration in PS sample, low concentrations in acetone extract and HU sample, and a very low concentration in the HA sample. The wide Fe^{3+} absorption line in PS sample corresponded to superimposed lines due to great concentrations of trivalent iron in these samples [10]. With acetone extract and HU sample, however, the narrow lines were due, possibly, to the presence of Fe^{3+} ion complexes in quasi-octahedral structure [11].

The ^1H NMR spectra of all extracts showed intense peaks at $\delta = 0.5\text{--}2.0$ ppm (aliphatic CH , CH_2 and CH_3) and less intense peaks at $\delta = 7.0\text{--}8.0$ ppm (aromatic $\text{Csp}_2\text{-H}$) and $\delta = 5.1\text{--}5.9$ ppm (non-aromatic $\text{Csp}_2\text{-H}$) (Table 2). All extracts showed peaks at $\delta = 2.0\text{--}2.6$ ppm, indicating the presence of hydrogen at carbon linked to carbonyl group. Absorption of the ethyl acetate, acetone, and ethanol extracts at $\delta = 3.4\text{--}4.3$ ppm indicated the presence of either hydroxy or amino group. The ^{13}C NMR spectral data of all samples showed common features in the aliphatic region (10 to 39 ppm) (Table 2). Peaks attributable to secondary or tertiary carbon linked to oxygen atoms or to tertiary amine carbon atoms were present in the ethyl acetate and ethanol extract spectra. The ethanol extract spectrum showed peaks at 94 ppm and

105 ppm, probably due to presence of non-aromatic Csp_2 . All analyzed extracts showed carbon peaks that are characteristic of aromatic carbon atoms (122 ppm – non-substituted carbon – to 150 ppm – substituted carbon). According to FTIR data (Fig. 3), the peak at 175 ppm in the ethanol extract spectrum corresponds to carboxylic ester. The absorption peak at 180 ppm of the ethyl acetate extract spectrum can be attributed to traces of carboxylic acid group. Due to high content of Fe^{3+} in the acetone extract the ^{13}C NMR spectrum was of poor quality.

3.2 FTIR and UV-vis spectrophotometry

The FTIR spectra of the PS extracts (Fig. 3) were consistent with data obtained through magnetic resonance spectroscopy. The ethyl acetate extract yielded a very broad and strong absorption pattern centered at 3433 cm^{-1} , assigned to $\nu(\text{O-H})$ of alcoholic or phenolic groups. The shoulder of this band at 3250 cm^{-1} can be attributed to $\nu(\text{N-H})$ of amide groups or to $\nu(\text{O-H})$ of H-bonded phenolic group structures.

The acetone extract produced similar features but with a lower intensity. All spectra showed absorption bands between 2956 cm^{-1} and 2841 cm^{-1} (CH_3 or CH_2 symmetric and anti-symmetric stretching). These absorption band intensities and the corresponding $\nu(\text{C-H})$ of aliphatic structures decreased

as the solvent polarity increased (Fig. 3). Absorption bands between 1680 cm^{-1} and 1737 cm^{-1} due to C=O stretching of carboxylate and carboxylic acid (acetone extract) and ester (ethanol extract) were perceived only in these extracts. The intense absorption band at 1680 cm^{-1} of the acetone extract can be attributed to several groups (see below for the HA spectrum) including $\nu(\text{O}-\text{C}=\text{O})$ of Fe^{3+} -coordinated carboxylates, consistent with the EPR spectroscopy data of these samples. The presence of carbohydrates only in the ethanol extract was indicated by the detection of a band (the most intense of the spectrum) at $1028\text{--}1036\text{ cm}^{-1}$.

The FTIR spectrum of the HA sample presented features that is common in this kind of material. A broad and very intense absorption peak at 3475 cm^{-1} and a shoulder at 3250 cm^{-1} were attributed to the O–H stretching of phenol and carboxylic groups. The $1730\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ region is analogous to that found in IR spectra of melanin of actinomycete and fungal samples; and of fresh HA sample [12, 13]. Thus, the spectrum showed two partially overlapping bands at 1725 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} of moderate to strong intensities. The former is assigned to $\nu(\text{O}-\text{C}=\text{O})$ of esters and carboxylic acids or $\nu(\text{C}=\text{O})$ of ketones, and the latter is attributed to H-bonded $\nu(\text{C}=\text{O})$ or $\nu(\text{C}=\text{O})$ of amides (amide I band) and $\nu(\text{O}-\text{C}=\text{O})$ of metal-coordinated carboxylates. The presence of carboxylate complexes of metal ions is consistent with the EPR spectroscopy data for Mn^{2+} and Fe^{3+} ions. The existence of carbohydrates in the HA sample is suggested by one band at $1030\text{--}1080\text{ cm}^{-1}$ [14].

The UV-visible spectra (200 to 800 nm) at room temperature of each solvent extract (Fig. 4) showed that hexane removes constituents absorbing light with wavelengths of 224 nm,

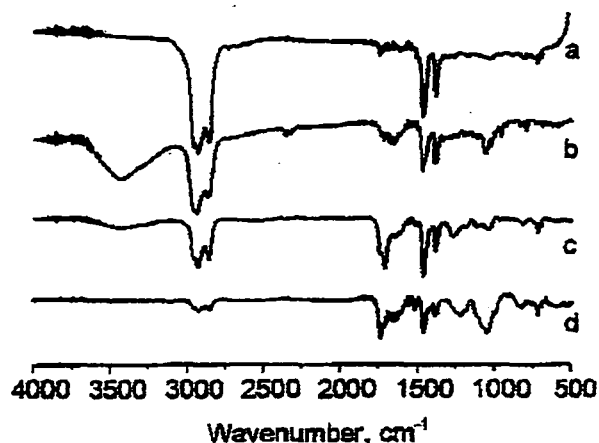


Fig. 3: FTIR spectra of PS organic solvent extracts.

FTIR-Spektren organischer Extrakte eines Rückstandes aus der Papierherstellung.

(a) hexane, (b) ethyl acetate, (c) acetone, (d) ethanol.

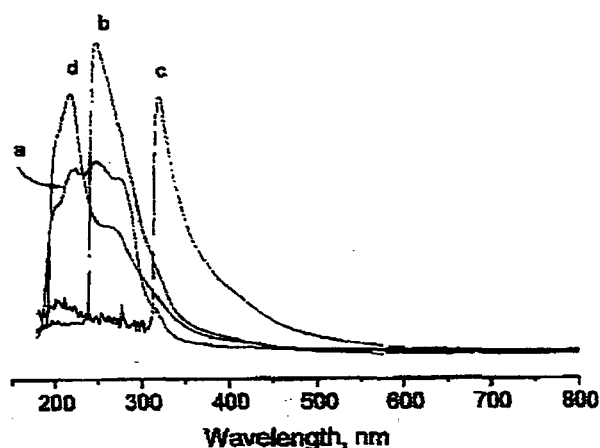


Fig. 4: UV-vis spectra of PS organic solvent extracts.

UV-vis-Spektren organischer Extrakte eines Rückstandes aus der Papierherstellung.

(a) hexane, (b) ethyl acetate, (c) acetone, (d) ethanol.

245 nm, 270 nm (maximum absorbance, λ_{max}), and 293 nm. As confirmed by GC-MS analysis, this extract is constituted mainly of aliphatic and non-condensed aromatic structures (non-published data). Ethyl acetate removed constituents with λ_{max} at 270 nm (aromatic substituted structures of low molecular weight); the acetone extract had a maximum light absorption at 342 nm and ethanol removed substances with absorption at 224 nm, 240 nm (λ_{max}), and 288 nm. Both, acetone and ethanol extracts probably contained carboxylic groups bound to unsaturated organic chains and carbohydrate structures.

Absorption intensities of HA UV-vis spectrum yielded two small shoulders at 222 nm and 288 nm. We determined the ratio $E_4/E_6 = 2.96$, where E_4 and E_6 are absorption intensities at 465 nm and 665 nm, respectively. The expected range of E_4/E_6 value for HA is from 3 to 5, with the ratios around 3 indicating a higher grade of aromatic condensation. This is expected with fresh HS derived from ligneous material [15]. The condensed aromatic structure of this HS could be explained by the participation of ligneous material in its formation.

4 Conclusions

The combination of previous solvent fractionating with EPR, ^1H NMR and ^{13}C NMR, FTIR and UV-vis spectroscopies analysis was a reliable analytical strategy to study the complex organic and inorganic mixtures contained in paper mill effluents. Lignin chromophoric Fe^{3+} complex structures were iden-

tified in all organic extracts and humic fraction, except in the hexane extract which is mainly composed of aliphatic hydrocarbon structures. The content of aliphatic hydrocarbon structures in the extracted fractions decreases as the polarity of the extractor solvents increases. The R–OH fraction of the PS sample was predominantly extracted by ethyl acetate. The Fe^{3+} octahedral complexes were detected only in the HU fraction and in the acetone extract. Acetone extracted most of the carboxylic and carboxylate groups. The latter was the most probable donor group to form the Fe^{3+} octahedral complex in the PS organic fraction. The $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -organic matter interaction is unusually strong, with 20 % of covalent character. These Mn^{2+} complexes of the PS sample in this study are concentrated in the HA fraction.

The previous solvent extractions of organic fractions for analyses with the spectroscopic techniques used in this experiment appeared to be an efficient step to gather insight into the complicated field of paper mill sludge characterization.

References

- [1] Maia, C. M. B. F.: Uso de Casca de *Pinus* e Lodo Biológico como Substrato para Produção de Mudas de *Pinus taeda*. Bol. Pesq. Fior. 39, 81–92 (1999).
- [2] Benedetti, V.: Utilização de Resíduos Industriais na RIPASA Celulose e Papel como Insumos na Produção Florestal. In: Gemini, L. A., Bellote, A. F. J., Bühl, L. T.: Seminário: Uso de Resíduos Industriais e Urbanos em Florestas. Proc., Botucatu, UNESP, 141–154 (1994).
- [3] Jackson, M. J., Line, M. A.: Windrow composting of a pulp and paper mill sludge: Process performance and assessment of product quality. Compost Sci. Utiliz. 5, 6–14 (1997).
- [4] Radwan, A., Willey, R. J., Davies, G.: Characteristics of sequential, solvent pre-extraction in the isolation of humic acid from the alga *Pilayella littoralis*. Chem. Eng. Comm. 172, 41–64 (1999).
- [5] Martin-Neto, L., Nascimento, O. R., Talamoni, J., Poppi, N. R.: EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil. Soil Sci. 151, 369–376 (1991).
- [6] Schnitzer, M.: Methods of Soils Analysis: Part 2. American Society of Agronomy, Madison, 1985.
- [7] Senesi, N.: Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. Adv. Soil Sci. 14, 97–102 (1990).
- [8] Goodman, B. A., Raynor, J. B.: Electron spin resonance of transition metal complexes. Adv. Inorg. Chem. Radiochem. 13, 135–362 (1970).
- [9] Mangrich, A. S., Lermen, A. W., Santos, E. J., Gomes, R. C., Coelho, R. R. R., Linhares, L. F., Senesi, N.: Electron paramagnetic resonance and UV-vis spectroscopic evidence for copper porphyrin in actinomycete melanins. Biol. Fertil. Soils 26, 341–345 (1998).
- [10] Mangrich, A. S., Machado, V. G., Tragheta, D. G., Lobo, M. A., Guimarães, E.: Criterious preparation and characterization of earthworm-composts in view of animal waste recycling. Part II. A synergistic utilization of EPR and ^1H NMR spectroscopies on the characterization of humic acids from composts. J. Braz. Chem. Soc., submitted.
- [11] Evmiridis, N. P.: Effect of crystal-structure and percentage of ion-exchange on electron-spin-resonance spectra of hydrated $\text{Fe}(\text{III})$ ion-exchanged synthetic zeolites. Inorg. Chem. 25, 4362–4369 (1986).
- [12] Gomes, R. C., Mangrich, A. S., Coelho, R. R. R., Linhares, L. F.: Elemental, functional group and infrared spectroscopic analysis of actinomycetes melanins from Brazilian soils. Biol. Fertil. Soils 21, 84–88 (1996).
- [13] Palm, S., Linhares, L. F., Mangrich, A. S., Martin, J. P.: Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. Biol. Fertil. Soils 10, 72–76 (1990).
- [14] Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M.: Chemical and physical characteristics of humic and fulvic acids extracted from soils of Mediterranean region. Geoderma 20, 87–104 (1978).
- [15] Davies, G., Fataftah, A., Radwan, A., Raffauf, R. F., Ghabbour, E. A., Jansen, S. A.: Isolation of humic acid from the terrestrial plant *Brugmansia sanguinea*. Sci. Total Environ. 201, 79–87 (1997).

[Received: 1 August 2000; accepted: 7 March 2001]



Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin

Jonas Stainsack^a, Antonio S. Mangrich^{a,*}, Claudia M.B.F. Maia^a,
Vanderlei G. Machado^b, Julio C.P. dos Santos^a, Shirley Nakagaki^a

^a Departamento de Química, UFPR, Centro Politécnico, Univ. Federal do Paraná, Jardim das Américas, LABEPR, C.P. 19081, CEP 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^b Universidade do Sul de Santa Catarina, UNISUL, Tubarão, SC, Brazil

Received 17 March 2003; accepted 13 June 2003

Dedicated to Professor J.J.R.F. da Silva on the occasion of his retirement, for all of his achievements.

Abstract

Understanding the interaction of metal ions with melanin structures is essential to know some intricate functions of this kind of compounds in the living systems. The coordination chemistry of vanadyl oxycation, VO(II), and copper, Cu(II), in a synthetic L-dopa melanin (SM) was investigated using electron paramagnetic resonance (EPR), Fourier transform infrared (FT IR) and ultraviolet–visible (UV–Vis) spectroscopy. The EPR and FT IR spectra indicated axially coordinated VO(II) ions bound to catecholate functional groups, and a fraction of the Cu(II) ions in a square planar structure partially coordinated to carboxylate functional groups. The resolved EPR perpendicular super hyperfine splitting constant, $A_{N\perp}$, and the Cu(II) complex EPR parallel parameters g_{\parallel} and A_{\parallel} values indicated two magnetically equivalent nitrogen atoms in a plane with the coordination sphere, CuN_2O_2 . The ultraviolet–visible (UV–Vis) spectra of solid samples indicate supramolecular structure constitution for the synthesized VO(II)SM and Cu(II)SM complexes.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Synthetic DOPA melanin; EPR spectroscopy; Copper and vanadium complexes; Melanin catecholate and indole-2-carboxylic acid coordination sites

1. Introduction

Melanins constitute a widespread class of pigment in nature, commonly formed by oxidative polymerization of catecholic species derived from tyrosine [1]. In soil, fungal and actinomycete melanins are thinking to be an important forerunner for the humic substance formation [2,3]. In man, melanins are present in the skin, ear and in certain brain structures like the Substantia Nigra and red nucleus, and the inner ear [4]. Despite having been

studied for so long, the exact structure of melanins has not been fully elucidated. The physico-chemical characteristics of melanins make them quite difficult to be studied by standard methods. The biological function of melanin remains mostly obscure. It is believed that in many pigment cells, melanin may act as a powerful antioxidant via, for example, heavy metal sequestration [5]. Natural melanins contain a wide variety of bound metals in vivo, and they are unusual among the biopolymers in that they are highly polyionic, cross-linked, and heterogeneous polymers, whose bonding patterns likely vary in subtle ways. The interaction of melanins with metal ions is of great importance for the organisms, and its study has always been of considerable

* Corresponding author. Tel./fax: +55-2141-361 3182.

E-mail address: mangrich@quimica.ufpr.br (A.S. Mangrich).

interest. The binding of metals affects the ability of native melanins to protect cells from harmful redox-active species such as reactive oxygen species (ROS) and photochemically generated radicals. A substantial amount of research today reflects a growing interest in the importance of the melanin capacity to bound metals ions [6–9]. Although the synthetic melanins are not a perfect model of the natural melanin pigments, they have been successfully used in studies of the redox, paramagnetic and ion exchange properties of natural melanins [5]. Spoganicz et al. [9] used potentiometric methods, in combination with mathematical fitting and correlative spectroscopies, to quantify the binding sites of a colloidal suspension of synthetic melanin, and to compare the metal binding affinities of the melanin functionalities. They used the derived binding constants to determine speciation of the Cu(II) and Zn(II) ions and concluded that they are coordinated to oxygen atoms of several functional groups of melanins at various pH. As in the proposed structure of synthetic melanin there were the hard ligand function catechol, and the softer ligand function amine and imine to complex metal ions we find it unusual that Cu(II) did not bind to melanin through the nitrogenous functions. The purpose of this work was to use electron paramagnetic resonance (EPR) Fourier transform infrared (FT IR) and UV–Vis spectroscopy to study the interaction of the melanin obtained by the air oxidation of the catecholamine L-dopa with the hard acid VO(II) and the softer one Cu(II), both very useful paramagnetic probes. EPR spectroscopy is a suitable tool for the study of the macromolecular organic compounds interaction with paramagnetic metal ions and may provide useful information about the coordinating atoms, oxidation states, modes of coordination and the geometry and the type of ligand sites [6,10,11].

2. Experimental

The synthetic melanin (SM) was prepared by an L-dopa (Aldrich) air-oxidation method. Briefly, 5 g of L-dopa were added to 1000 ml of distilled and deionized water. Later, 1 mol l⁻¹ NH₄OH (Merck) aqueous solution was added drop-wise until pH ~ 9. The mixture was maintained under stirring while a continuous stream of filtered air was passed through it. In order to avoid contact with another reactants (e.g. phosphate), other buffers were not used. The pH was controlled during the reaction time with successive additions of NH₄OH solution. After 4 days, the resulting black suspension was treated with drops of 6 mol l⁻¹ HCl (Ecibra) aqueous solution to bring the pH down to 2.0, and after 1 h, the black suspension formed was centrifuged. The precipitate was washed five times with 0.01 mol l⁻¹ HCl and several times with distilled and deionized water and

then dried over P₂O₅ (Aldrich) under vacuum. CuSO₄·5H₂O or VOSO₄·5H₂O were purchased from Merck. The metal ion complexes were obtained by adding 100 mg of SM to 50 ml of 0.1 mol l⁻¹ CuSO₄·5H₂O or VOSO₄·5H₂O aqueous solutions. After standing for 24 h, the mixture was centrifuged and the precipitate was recovered and washed four times with 0.01 mol l⁻¹ HCl (to eliminate weakly adsorbed Cu(II) or VO(II) ions) and then several times with deionized water. The Cu(II)SM complex was treated with sodium dithionite solution, according to the literature [12], in order to reduce the copper (II) bonded to only oxygen ligands. The complexes were dried over P₂O₅ under vacuum. IR spectra were recorded at room temperature with a Bomen FT IR MB 100 spectrometer. KBr pellets were obtained by pressing uniformly prepared mixtures of 1 mg of SM, or the Cu(II) or VO(II) ion SM complexes, and 99 mg of spectrometry grade KBr. For the UV–Vis analysis of the solid samples a Shimadzu 2401PC spectrophotometer, with the integrating sphere assembly 204-52454-01 was used. EPR experiments were carried out at r.t. on a Bruker ESP 300E spectrometer operating at X-band frequency (~9.5 GHz) with 100 kHz field modulations. A weak pitch standard from Bruker (*g* = 2.0028) was used as reference. Microanalyses were carried out with a Perkin–Elmer model 240 analyzer. The carboxylic and phenolic acidities determinations were performed in an argon inert atmosphere by following the method of Schnitzer and Gupta [13].

3. Results and discussion

3.1. Microanalyses and acidity determinations

Comparison between the experimental values obtained for the SM (C = 49.5%, H = 3.0% and N = 8.2%) with the theoretical values calculated for the L-dopa (C = 54.8%, H = 5.6% and N = 7.1%) demonstrates that the carbon and hydrogen percentages decrease whereas nitrogen percentages increase in the melanization process. The decreasing carbon percentage can be explained by the decarboxylation undergone for parts of the L-dopa derivatives in the melanization pathway [14]. The decrease in hydrogen percentage occurs mainly by the loss of this element during the oxidative synthesis, in the steps from dopa to the dopaquinone and to the 5,6-dihydroxyindole or/and to 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid intermediaries [14]. The phenolic acidity found for the SM (9.05 mmol H⁺ g⁻¹ SM) is less than that calculated for the beginning compound (10.24 mmol H⁺ g⁻¹ L-dopa). Some phenolic oxygen atoms might be involved in the linkages amongst the indole units in the SM or might be in the quinone form thereby decreasing the phenolic acidity. The existence of the equilibrium, catechol ↔

semiquinone \leftrightarrow quinone in the synthesized melanin is supported by EPR spectroscopy (see below) where there is one absorption line with $g = 2.0037$ for the SM, which is characteristic of semiquinone functions [15]. By the other hand, this equilibrium confirms also the existence of phenol groups as catechol function in the SM, an excellent ligand site for hard metal ion chelation. This conclusion is also supported if we agree with the fact that the most of the catechol group of the SM precursors, the L-dopa, continue to exist after the oxidation steps [14]. The determined carboxyl group content in the SM ($3.07 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1} \text{ SM}$) is 42% lower than that calculated for the L-dopa structure ($5.29 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1} \text{ L-dopa}$). These facts agree with the proposed melanization mechanism that suggests the transformation of part of the dopachrome intermediary in 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and part in the 5,6-dihydroxyindole, with loss of CO_2 [14].

3.2. FT IR analyses

Fig. 1 depicts the FT IR spectra of the SM and its metal ion complexes with the VO(II) and Cu(II) ions.

The major absorption bands for the SM (upper spectrum) can be seen at $3200\text{--}3400 \text{ cm}^{-1}$ (carboxylic/phenolic O–H and N–H stretching), 1712 cm^{-1} (C=O of COOH stretching), 1610 cm^{-1} (aromatic C=C stretching and COO^- asymmetrical stretching), 1395 cm^{-1} (phenolic C–O–H bending) and 1220 cm^{-1} (C–O stretching and C–O–H asymmetrical stretching of COOH) [2,3]. Comparison of the SM spectrum with the spectra for its metal ion complexes (Fig. 1, bottom spectra) reveals that for the Cu(II)SM complex the absorption band at 1712 cm^{-1} is less intense than for the VO(II)SM complex, indicating the involvement of carboxylic groups on the Cu(II) ion complexation. For the VO(II) complex, the absorption band at 1712 cm^{-1} is stronger and the band at 3200 cm^{-1} become relatively less intense under complexation, indicating the preferential interaction of VO(II) ions with phenolic groups of the SM structure. An absorption band due to V–O stretching at 970 cm^{-1} is also observed in the VO(II)–

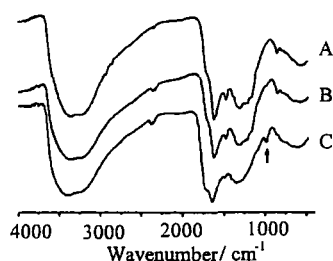


Fig. 1. FT IR spectra of synthetic melanin (A) and its complexes with the ions Cu(II) (B) and VO(II) (C).

humic acid complex spectrum [16]. In vanadyl complexes, this band is observed in the $950\text{--}1050 \text{ cm}^{-1}$ range, depending on the equatorial ligand field and the *trans*- effect when there is a sixth (axial) ligand. In octahedral complexes this band is found closer to 950 cm^{-1} , indicating weakening of the V–O bond by the *trans*- effect and/or by a strong ligand field on the equatorial positions, while this band is found in higher wave numbers for square pyramidal complexes [17]. The observed absorption at 970 cm^{-1} is suggestive of a strong equatorial ligand field. The main differences between the Cu(II) and VO(II) SM FT IR spectra is that the spectrum of the Cu(II)SM complex have a stronger decrease in absorption at 1712 cm^{-1} compared with the spectrum of the VO(II)SM complex, indicating that the carboxylic groups are involved, at least partially, in the case of the Cu(II) ion and not in the VO(II) ion coordination [18]. The phenol groups forming catechol structure seems fundamental for the vanadyl ion chelation in a VO(II)O₄ form. This conclusion is also supported if we agree with the fact showed above that the most of the catechol group of the SM precursors L-dopa continue to exist, whereas a part of the carboxyl groups are lost after the oxidation process. The Cu(II) ions would be binding to SM using nitrogenous and oxygenated functions of the organic structures.

3.3. UV–Vis spectra

All UV–Vis solid sample spectra (Fig. 2) show a monotonic reflectance increase from 500 until 850 nm. The spectrum of the SM presents the depth reflectance intensity increased most than that of the SM metal complexes [8]. This achievement could be explained if the metal ions behave like “bridges”, binding together the SM molecules and extending the conjugation, and indicates that metal ion–SM complexes behave as

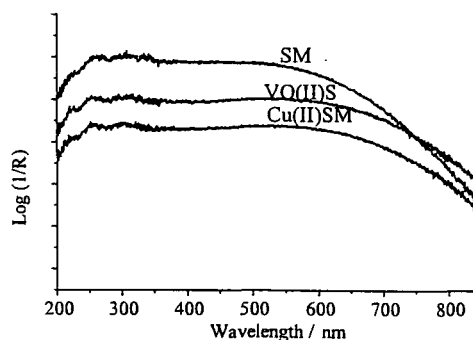


Fig. 2. UV–Vis spectra of synthetic melanin (upper), and its complexes with the ions VO(II) (medium) and Cu(II) (bottom).

Table 1
EPR data of SM, VO(II)SM and CuSM complexes

Sample	A_z^a	A_y^a	A_x^a	$A_{N\perp}^a$	A_{iso}^a	g_z^b	g_y^b	g_x^b	g_{iso}^b	g_z/A_z	g^c
SM											2.0037
VO(II)SM	172.2	64.3	64.3		100.7	1.941	1.981	1.981	1.968		ND
Cu(II)SM	180.0	25.0	25.0	17	77	2.260	2.080	2.080	2.140	125	2.0037

^a Hyperfine splitting constant (A) values in 10^{-4} cm^{-1} units.

^b Metal ions SM complexes g -values.

^c Organic free radical g values.

associations of relatively small molecules in supramolecular structures.

3.4. EPR measurements

The EPR spectrum of the SM (not showed) performed in powder depict just one line with $g = 2.0037$ (Table 1), characteristic of organic free radical, probably *o*-semiquinones [15]. Figs. 3 and 4 show the EPR spectra for the VO(II)SM and the Cu(II)SM complexes, respectively, and the table lists the EPR parameters founds.

The EPR parameters for the VO(II)SM complex (Table 1) suggests, as previously discussed in relation to the FT IR measurements, that the metal ion VO(II) is in an axial symmetry environment, with oxygen as coordinating atoms. Moorhead and Sutin [19] and McPhail and Goodman [20] had made a correlation between the EPR parameters A_{iso} and g_{iso} values for VO(II) complexes in different ligand environments. Inserting the VO(II)SM complex parameters A_{iso} and g_{iso} (Table 1) within these correlation showed that this complex is situated in the range that characterizes four oxygen atoms as equatorial ligands for the VO(II). Reeder and Rieger [21] showed that π bonding is much more effective with hydroxyl phenolic groups than with carboxyl groups, because of the resonance effect that

does not occur for carboxyl groups. These suggestions is in agreement with the fact that a lot of hydroxyl phenolic groups, mainly as catechol functions, are present in the melanin structure, and are able to chelate VO(II) ions. It is consistent with the relatively low V–O IR stretching frequency that was observed above (970 cm^{-1}). The in-plane π bonding is strong enough to approximate the equatorial ligands, dismissing the apical oxygen and weakening the axial π bonding.

The EPR spectrum of the Cu(II)SM complex present axial symmetry, with $g_x = g_y$, $A_x = A_y$, and, $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$ (Table 1) that suggests a distorted tetragonal, square pyramidal or a square planar geometry. The ratio $g_{\parallel}/A_{\parallel}$ values may be used to estimate this distortion extent. In general, complexes with values between 105 and 145 cm have planar square configuration, and those with values 135–250 cm have distorted tetrahedron configurations [22]. The Cu(II)SM studied here presents this ratio equal to 125 cm, indicating a square planar configuration for this complex. Moreover, the g_{\parallel} and A_{\parallel} values of the Cu(II)SM are found in the regions of the CuN_2O_2 chromophores in the g_{\parallel} versus A_{\parallel} diagram [23].

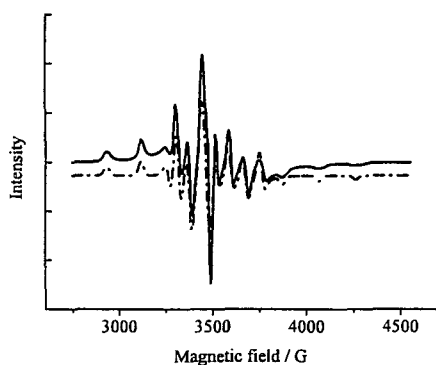


Fig. 3. EPR spectra for VO(II) synthetic melanin complex, experimental (full line) and simulated (dash dot).

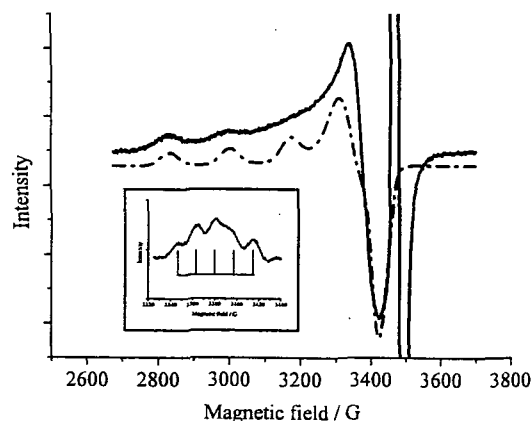
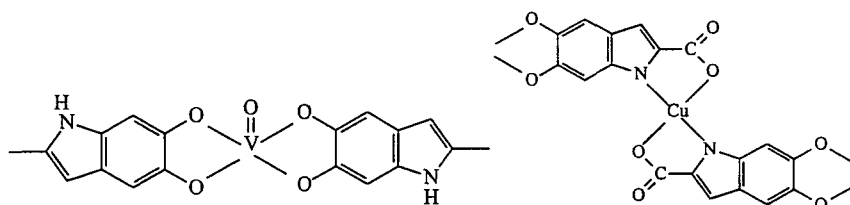


Fig. 4. EPR spectra for Cu(II) synthetic melanin complex, experimental (full line) and simulated (dash dot). The insert shows the perpendicular spectrum in second derivative mode.

The spectrum for this complex in first derivative mode did not show apparent evidence of coupling with two

paramagnetic probes would be as showed in the structures below.



nitrogen atoms (Fig. 4) (there was not sufficient resolution showing the corresponding lines). The EPR spectrum in second derivative mode shows the resolution of the perpendicular region in consequence of the copper (II) interaction with two-nitrogen ligand (Fig. 4, insert). It may be seen that these ligand atoms form more stable complexes with copper (II) by increasing the electronic density on the metal ion and turning their reduction more difficult by the treatment with dithionite. In this way, it was possible to improve the resolution of the perpendicular region of the spectrum, with the appearance of five lines. The resolved EPR superhyperfine splitting constant, $A_N = 17$ G, indicate the occurrence of 2 equiv. nitrogen atoms bonded to the copper (II) ion.

The EPR parameters obtained by simulation of the experimental spectrum (Table 1) and the FT IR data indicate the occurrence of 2 equiv. nitrogen atoms bonded to the Cu(II) [11] and two oxygen atoms from carboxylate groups. This fact implies that some indole units in the melanin are bonded in a way where the nitrogenous groups are in proper positions to chelate the Cu(II) ions. A proposed SM fragment, supported by our FT IR, EPR and UV–Vis spectroscopy evidences, may involve two indole-2-carboxylic acid units [14] from distinct SM molecules. In the spite of the fact that other kinds of linkages among the indole units are possible, the localization of the nitrogen groups makes metal ion chelation through two nitrogen atoms difficult or even impossible. Another point to be examined is that the EPR experiments again do not agree with Zajac's model in which there are four nitrogen atoms like in a porphycene structure appropriated for complexation mainly of the Cu(II) ions [12]. If the Cu(II) ion was coordinated with four nitrogen atoms, there should be nine lines in the perpendicular EPR spectrum [6].

We propose that the structure and the type of the ligand sites in the synthetic melanin studied by the use of hard acid metal ion VO(II) and the softer one Cu(II) as

These studies were very fruitful and brought important information about the SM structure. Although studies involving paramagnetic ions to probe the structure of complex macromolecule organic structures like humic substances and actinomycete melanins have been done before, the study reported here represents, to the best of our knowledge, the first systematic study of a melanin structure with the help of this strategy.

The experimental approach presented here is being currently applied with success in our laboratory in studies of characterization of melanins synthesized by another synthetic procedures.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq fellowship and grants from CNPq, PADCT and FAPR.

References

- [1] S. Gidanian, P.J. Farmer, *J. Inorg. Biochem.* 89 (2002) 54.
- [2] S. Paim, L.F. Linhares, A.S. Mangrich, J. Martin, *Biol. Fertil. Soils* 10 (1990) 72.
- [3] R.C. Gomes, A.S. Mangrich, R.R.R. Coelho, L.F. Linhares, *Biol. Fertil. Soils* 21 (1996) 84.
- [4] A.F. Ausbery, *J. Chromatogr. B* 768 (2002) 67.
- [5] C.L. Serpentine, C. Gauchet, D. de Montauzon, M. Comtat, J. Ginestar, N. Paillous, *Electrochim. Acta* 45 (2000) 1663.
- [6] A.S. Mangrich, A.W. Lermen, E.J. Santos, R.C. Gomes, R.R.R. Coelho, L.F. Linhares, N. Senesi, *Biol. Fertil. Soils* 26 (1998) 341.
- [7] M. R'Oyzanowska, T. Sarna, E.J. Land, T.G. Truscott, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 518.
- [8] W.J. Barreto, S.R.G. Barreto, M.A. Santos, R. Schimdt, F.M.M. Paschoal, A.S. Mangrich, L.F.C. de Oliveira, *J. Inorg. Biochem.* 84 (2001) 89.
- [9] B. Szpoganicz, S. Gidanian, P. Kong, P. Farmer, *J. Inorg. Biochem.* 89 (2002) 245.
- [10] L. Lopiano, M. Chiesa, G. Digilio, S. Giraudo, B. Bergamasco, E. Torre, M. Fasano, *Biochim. Biophys. Acta* 1500 (2000) 306.

- [11] E. Guimarães, A.S. Mangrich, V.G. Machado, D.G. Traghetta, M.A. Lobo, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 734.
- [12] G.W. Zajac, J.M. Gallas, J. Cheng, M. Eisner, S.C. Moss, A.E. Alvarado-Swaigood, *Biochim. Biophys. Acta* 1199 (1994) 271.
- [13] M. Schnitzer, U. Gupta, *Soil Sci. Soc. Proc.* 29 (1965) 274.
- [14] G.M. Robinson, E.I. Iwuoha, M.R. Smyth, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3489.
- [15] C.C. Felix, J.S. Hyde, T. Sarna, R.C. Sealy, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 3922.
- [16] A.S. Mangrich, N.V. Vugman, *Sci. Total Environ.* 75 (1988) 235.
- [17] J.A. Bonadies, C.J. Carrano, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4088.
- [18] B. Bilinska, *Spectrochim. Acta Part A-Mol. Biomol. Spectrosc.* 57 (2001) 2525.
- [19] E.G. Moorhead, N. Sutin, *Inorg. Chem.* 5 (1966) 1866.
- [20] D.B. McPhail, B.A. Goodman, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 83 (1987) 3627.
- [21] R.R. Reeder, P.H. Rieger, *Inorg. Chem.* 10 (1971) 1258.
- [22] J. Müller, K. Felix, C. Maichle, E. Lengfelder, J. Strähle, U. Weser, *Inorg. Chim. Acta* 233 (1995) 11.
- [23] U. Sakagushi, A.W. Addison, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1979) 600.



Laboratório de Projetos e Processos Ambientais
Departamento de Química
Universidade Federal do Paraná

REALIZAÇÃO



APOIO



AGRADECIMENTOS



Serviço gráfico Emater-PR

COMPOSTAGEM DE RESÍDUOS FLORESTAIS

Um guia para produção de húmus através da
reciclagem e aproveitamento de resíduos florestais



PROGRAMA Paraná 12 MESES
Governo do Estado do Paraná

Curitiba
2003

DADOS DA PUBLICAÇÃO

Revisão: Katia Regina Pichelli

Diagramação e Arte-final: Luciane Cristine Jaques

Relação de Autores de fotografias:

Amilton J. Baggio - p.18

Césio Righesso - p.10 (as 2 fotos na parte superior da página)

Claudia Maia - p.4, 17, 23 e 24

Francisco Santana - p.21 e foto da capa

Rosana Clara V. Higa - p.10 (a foto na parte inferior da página)

SUMÁRIO

1. Resíduos florestais e o ambiente.....	03
2. A Compostagem	05
3. O que pode ser compostado	09
4. O que influencia a velocidade de compostagem	11
5. Como preparar uma boa mistura de resíduos.....	15
6. Tipos de compostagem e bioreatores.....	15
7. A compostagem da serragem	19
8. Usos do composto e produtos comerciais	23
9. Conclusões.....	25
Referências bibliográficas.....	26

EQUIPE TÉCNICA

- ☒ Claudia Maria B.F. Maia, Pesquisadora, Embrapa Florestas
- ☒ Cristiane R. Budziak, Dep. Química, UFPR
- ☒ Ronei, E. da Paixão, Técnico Químico, Tecpar
- ☒ Antonio S. Mangrich, Professor PhD., Dep. Química, UFPR

1 - Resíduos florestais e o ambiente

No Brasil, um sério problema ambiental é a contaminação dos solos e de lençóis freáticos por causa do acúmulo de resíduos das indústrias madeireiras, tais como serragem, cascas, cepilhos, etc.

Cerca de 14% do volume de toras processadas em serrarias da Região Sul do Brasil se transformam em serragem. Embora parte deste volume seja usado como combustível ou como componente da indústria de chapas, existe um grande excedente não utilizado, principalmente nas pequenas serrarias, onde o rendimento no processamento é geralmente mais baixo. Normalmente, parte desta serragem é queimada em aterros inadequados, acarretando o desprendimento de chorumes, de alta carga orgânica tóxica, provocando danos ao ambiente, principalmente em córregos, rios e mananciais de uso municipal.

O grande volume de resíduos gerados pelas indústrias de transformação da madeira é um problema existente em praticamente todas as serrarias brasileiras.

Embora as empresas modernas incluam em sua atividade, o gerenciamento ambiental e o aproveitamento integrado de seus subprodutos, a maioria das serrarias instaladas ainda está despreparada para o descarte apropriado de seus rejeitos. O sistema mais utilizado no descarte é o depósito a céu aberto em pátios desprovidos de qualquer controle ambiental.

O acúmulo de serragem no ambiente traz grandes problemas, principalmente pelo desprendimento de chorumes tóxicos que acabam atingindo os recursos hídricos.



Por outro lado, práticas agrícolas inadequadas tornam os solos áridos, erodidos e inférteis. A adição no solo de matéria orgânica originada das atividades industriais ajuda na recuperação da fertilidade dos solos e é uma maneira promissora de reciclar estes materiais que antes eram desperdiçados.

Resíduos orgânicos, de origem industrial ou agrícola, são fontes importantes de carbono (C) proveniente de diversos ecossistemas. O C contido em florestas e nos solos contribui significativamente para a imobilização e o seqüestro deste elemento, evitando o aumento de gases atmosféricos de efeito estufa e, portanto, contribuindo para o menor aquecimento do planeta.

2 - A Compostagem

Há muito tempo, por todo o mundo, agricultores espalham esterco animal e outros dejetos orgânicos no campo para melhorar a fertilidade do solo. A aplicação de resíduos orgânicos no solo requer, no entanto, que estes materiais sejam apropriadamente tratados. Resíduos orgânicos, de origem animal ou vegetal, apresentam várias espécies de microorganismos e alguns deles podem ser perigosos para a saúde de animais e plantas.

A COMPOSTAGEM é geralmente considerada o processo mais eficiente de tratamento e estabilização de resíduos orgânicos, produzindo a custos aceitáveis um produto higiênico e útil: o COMPOSTO.

A compostagem é definida como um processo biológico e aeróbio de tratamento de resíduos orgânicos para a produção de composto. A compostagem elimina fatores adversos ao meio ambiente, causados pela degradação não controlada da biomassa, e aumenta o valor nutricional do composto resultante em relação ao material de partida.

Na compostagem atuam diferentes microorganismos tais como fungos, bactérias e actinomicetos, que podem ser agrupados em duas classes quanto à resistência à temperatura do substrato: os microorganismos mesófilos, os quais atuam a temperaturas ótimas entre 25° C e 40° C e os microorganismos termófilos, os quais atuam a temperaturas ótimas entre 50° e 60°. O processo da compostagem consiste, de modo simplificado, em 3 etapas:

- uma breve fase inicial onde microorganismos mesófilos atuam;
- uma fase intermediária onde atuam microorganismos termófilos;
- uma fase de maturação, onde microorganismos mesófilos voltam a dominar e onde ocorrem os principais processos da humificação.

Em um sistema de boa eficiência, a fase termófila se instala já nos primeiros dias de compostagem. Nesta fase ocorre intensa atividade biológica com alto consumo de oxigênio (O₂) e alta produção de dióxido de carbono (CO₂). Nesta fase, o regime de aeração é fundamental para o sucesso e velocidade da compostagem.

O principal componente orgânico do composto é o HÚMUS, que é também o principal componente da matéria orgânica natural (MON). O termo húmus remonta ao tempo dos antigos romanos e tem sido usado tanto para descrever os constituintes húmicos e não húmicos da MON, quanto como sinônimo de SUBSTÂNCIAS HÚMICAS (SH). O termo húmus será definido aqui, como o conjunto de substâncias orgânicas do solo, excetuando-se os tecidos biológicos não degradados, seus produtos de decomposição e a biomassa do solo. O húmus possui propriedades físico-químicas inteiramente diferentes do material vegetal ou animal original.

A adição de húmus ou composto ao solo pode aumentar suas fertilidade e produtividade agrícola. Por outro lado, a adição de matéria orgânica não amadurecida no solo causa vários problemas relacionados com a fertilidade, sanidade e erosão dos solos.

QUALIDADE DO COMPOSTO

Dois termos definem a qualidade do composto quanto ao seu grau de decomposição: a ESTABILIDADE e a MATURIDADE. A estabilidade está relacionada à atividade microbiana e a maturidade ao potencial de crescimento vegetal. Compostos instáveis contêm altas quantidades de matéria orgânica facilmente degradável e sua aplicação no solo pode levar a perda de MON e quebra de estrutura e erosão dos solos. Além disso, compostos instáveis podem afetar a atividade microbiológica, causar deficiência de nitrogênio e oxigênio no solo e mesmo liberar substâncias fitotóxicas no ambiente. A maturidade do composto está relacionada com a presença de SH no composto, que são produzidas principalmente no último estágio da compostagem ou na fase de maturação. A caracterização química de SH ao longo do processo de compostagem é, portanto uma etapa fundamental para compreender o processo de humificação e suas implicações na qualidade do composto.

A adição regular de MON e SH no solo melhora suas propriedades químicas e físicas através da:

- ▣ função nutricional, servindo como fonte de nutrientes para as plantas, especialmente N, P e micronutrientes;
- ▣ função biológica, incrementando a atividade microbiana benéfica e aumentando a diversidade biológica;
- ▣ função físico-química, promovendo a estruturação adequada, melhorando a aeração, a retenção de umidade, a capacidade de troca catiônica ou CTC e a capacidade tampão do solo.

Além disso, a MON interage com diversos poluentes, incluindo metais pesados, pesticidas, herbicidas, etc., diminuindo o potencial tóxico e aumentando a velocidade de degradação dos contaminantes.

SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Durante a compostagem, parte da MON é mineralizada a CO_2 , a amônia (NH_3) e a água (H_2O), e outra parte é transformada em substâncias húmicas. As SH constituem um conjunto complexo de substâncias orgânicas, resultantes de transformações microbianas e químicas. Nos solos, as SH podem constituir mais de 80% da MON.

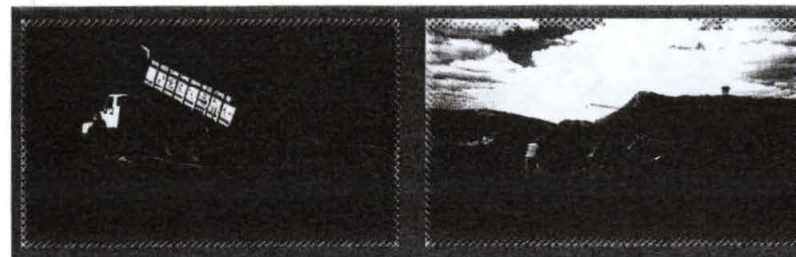
Os ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e humina (HU) são as principais frações dos componentes húmicos da MON. A fração AH é solúvel a pH alcalino, a fração AF é solúvel a qualquer valor de pH e a fração HU é insolúvel a toda faixa de pH.

A natureza química e a reatividade das substâncias húmicas ditam as propriedades físicas, químicas e bioquímicas do solo, interferindo principalmente na capacidade de troca catiônica (CTC) e na capacidade de formar agregados estáveis, conferindo uma melhor granulometria aos solos.

3 - O que pode ser compostado

Tradicionalmente, são compostados materiais de origem agrícola. Este tipo de material em geral é isento de contaminantes e, quando compostado corretamente, produz fertilizante orgânico de boa qualidade e apto para uso nas lavouras. Porém, atualmente, o composto pode ser produzido de outras fontes orgânicas como:

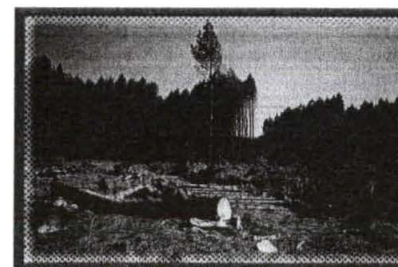
- resíduos de indústrias agrícolas ou de alimentos - em geral estes resíduos são boa fonte de matéria orgânica e isentos de contaminação. A relação carbono/nitrogênio (C/N) pode variar muito. Leguminosas são fontes ricas em N e gramíneas em C. A mistura destes dois tipos de material é quase sempre adequada;
- resíduos da horticultura de áreas urbanas e jardinagem (restos de poda, folhas de árvores e gramas) - estes resíduos podem estar contaminados por chumbo proveniente da queima da gasolina e com outros metais produzidos por atividades urbanas (zinco e cádmio, por exemplo). Recomenda-se proceder a análise de metais do composto pronto, uma vez que existe a tendência da acumulação destes contaminantes após a compostagem;
- lodos municipais - a compostagem destes materiais com outros resíduos ricos em carbono é uma maneira de diluir o teor de contaminantes a níveis ambientalmente aceitáveis. Geralmente é um resíduo prontamente disponível e de baixo custo;
- cascas de árvores, serragem, cavacos de madeira - devido à alta relação C/N, estes materiais precisam da adição de um outro resíduo rico em nitrogênio, tais como os esterco ou camas de



aviário. Os lodos municipais e de estações de tratamento de efluentes (ETE) também podem ser usados. Porém, sempre se deve monitorar o teor de metais pesados;

- lodos industriais lodos ricos em matéria orgânica em geral são provenientes de ETE e sua qualidade e periculosidade dependem tanto da atividade industrial envolvida em sua geração quanto da eficiência da ETE. Lodos ativados são ricos em nutrientes e em microrganismos. A análise de metais pesados e microrganismos patogênicos pode garantir a qualidade do produto final;
- refugo doméstico - por ser produzido em pequenas quantidades, este resíduo é indicado para uso não comercial e pode ser usado em misturas com podas e aparas de jardins e gramados.

Reciclar resíduos orgânicos é retornar para os solos e florestas parte do Carbono que dela foi extraído, contribuindo para a sustentabilidade dos ecossistemas.



4 - O que influencia a velocidade de compostagem

A velocidade de compostagem depende de fatores como a aeração, temperatura, umidade, relação carbono/ nitrogênio (C/N), estrutura e pH.

a - aeração

Sendo a compostagem um processo aeróbio, o fornecimento de ar é vital à atividade microbiana, pois os microorganismos aeróbios tem necessidade de O₂ para oxidar a matéria orgânica que lhes serve de alimento.

Durante a compostagem, a demanda por oxigênio pode ser bastante elevada e a falta deste elemento pode se tornar um fator limitante para a atividade microbiana e prolongar o ciclo de compostagem. A circulação de ar na massa do composto é, portanto, de importância primordial para a compostagem rápida e eficiente. Esta circulação depende da estrutura e umidade da massa e também da tecnologia de compostagem utilizada.

A aeração também influi na velocidade de oxidação do material orgânico e na diminuição da emissão de odores, pois quando há falta de aeração o sistema pode tornar-se anaeróbio. Seja qual for a tecnologia utilizada, a aeração da mistura é fundamental no período inicial da compostagem - fase de degradação rápida, onde a atividade microbiana é intensa. Na fase seguinte - a maturação, a atividade microbiana é pouco intensa, logo a necessidade de aeração é bem menor.

b - temperatura

A compostagem ocorre tanto em temperatura termófila (45 a 60°C) como mesófila (25 a 40°C). Embora a elevação da

temperatura seja necessária e interessante para a eliminação de microorganismos patogênicos, alguns pesquisadores observaram que a ação dos microorganismos sobre a matéria orgânica aumenta com a elevação da temperatura até 65° C e que, acima deste valor, o calor limita as populações aptas, havendo um decréscimo da atividade biológica.

A temperatura é um fator indicativo do equilíbrio biológico, de fácil monitoramento e que reflete a eficiência do processo. Se o processo de compostagem registrar temperatura entre 40 e 60° C no segundo ou terceiro dia, é sinal que o ecossistema está bem equilibrado e que a compostagem tem todas as chances de ser bem sucedida. Caso contrário, é sinal de que os parâmetros físico-químicos (pH, relação C/N, umidade) não estão adequados, limitando assim a atividade microbiana.

Depois de iniciada a fase termófila (em torno de 45° C), o ideal é controlar a temperatura entre 55 e 65° C. Esta é a faixa de temperatura ótima que permite a máxima intensidade de atividade microbiológica.

Atualmente, a aeração também é usada como meio de controlar a temperatura. Em certos casos, a injeção de ar comprimido na massa do composto pode ser de 5 a 10 vezes maior do que o estritamente necessário à respiração microbiana, tendo assim a função de dissipar o calor liberado no processo (processo Kneer).

c - umidade

A água é fundamental para a vida microbiana. No composto, o teor ótimo de umidade, de modo geral, situa-se entre 50 e 60%. O ajuste da umidade pode ser feito pela mistura criteriosa de componentes ou pela adição de água. Na prática, verifica-se que o teor de umidade depende também de eficácia da aeração e das características físicas dos resíduos (estrutura, porosidade).

Elevados teores de umidade (> 65%) fazem com que a água ocupe os espaços vazios do meio, impedindo a livre passagem do oxigênio, o que pode provocar o aparecimento de zonas de anaerobiose e conseqüente mau cheiro. Se o teor de umidade da mistura é inferior a 40%, a atividade biológica é inibida, bem como a velocidade de biodegradação.

Porém, como há perdas de água devido à aeração, em geral o teor de umidade do composto tende a diminuir ao longo do processo. Portanto, o teor de umidade é um dos parâmetros que deve ser monitorado durante a compostagem para que o processo se desenvolva satisfatoriamente.

Resíduos com alto teor de umidade, como os lodos, a serem compostados devem passar previamente por processo de desaguamento ou desidratação para eliminar o excesso de água.

d - relação carbono/nitrogênio

Os microorganismos necessitam de carbono como fonte de energia e de nitrogênio para síntese de proteínas. É por esta razão que a relação C/N é considerada como o fator que melhor caracteriza o equilíbrio do substrato.

Teoricamente, a relação C/N inicial ótima do substrato deve se situar em torno de 30. Na realidade, constata-se que ela pode variar de 20 a 70 de acordo com a maior ou menor biodegradabilidade do material de partida. Tanto a falta de nitrogênio quanto a falta de carbono limita a atividade microbiológica. Se a relação C/N for muito baixa, pode ocorrer grande perda de nitrogênio pela volatilização da amônia. Se a relação C/N for muito elevada, os microorganismos não encontrarão N suficiente para a síntese de proteínas e terão seu desenvolvimento limitado. Como resultado, o processo de compostagem será mais lento. Independentemente da relação C/N inicial, no final da compostagem a relação C/N converge para um

mesmo valor, entre 10 e 20, devido à perdas maiores de carbono do que de nitrogênio no desenvolvimento do processo.

e - estrutura

Quanto mais fina é a granulometria, maior é a área exposta à atividade microbiana, o que promove o aumento das reações bioquímicas, visto que aumenta a área superficial em contato com o oxigênio. De modo geral, condições ótimas de compostagem são obtidas com substratos apresentando de 30 a 36% de porosidade, o que dá um tamanho médio das partículas entre 25 e 75 mm para ótimos resultados.

Porém, caso o substrato apresente granulometria muito fina como por exemplo o lodo de esgoto, a aeração do composto torna-se difícil, sendo necessária a mistura com outro resíduo de granulometria mais grossa para conferir melhor estrutura porosa à mistura a ser compostada.

f - acidez e pH

É fato conhecido que níveis de pH muito baixos ou muito altos reduzem ou até inibem a atividade microbiana.

Quando são utilizadas misturas com pH próximo da neutralidade, o início da compostagem (fase mesófila) é marcado por uma queda sensível de pH, variando de 5,5 a 6,0, devido à produção de ácidos orgânicos.

Quando a mistura apresentar pH próximo de 5,0 ou ligeiramente inferior, há uma diminuição drástica da atividade microbiológica e o composto pode não passar para a fase termófila. Na fase termófila ocorre rápida elevação do pH, que se explica pela hidrólise das proteínas e liberação de amônia. Assim, normalmente o pH se mantém alcalino (7,5 - 9,0) durante esta fase.

De qualquer forma, e principalmente se a relação C/N da mistura for conveniente, o pH geralmente não é um fator crítico da

5 - Como preparar uma boa mistura de resíduos

Uma boa mistura para ser compostada consiste portanto de um material rico em C, triturado a uma granulometria que permita a aeração adequada, e um material rico em N, que geralmente é também portador dos microorganismos necessários ao início do processo, o inóculo.

Boas fontes de C são as palhas, a serragem, cascas, etc.. Boas fontes de N e inóculos são os esterco, os lodos municipais ou industriais, algumas tortas da agroindústria, etc.

6 - Tipos de compostagem e bioreatores

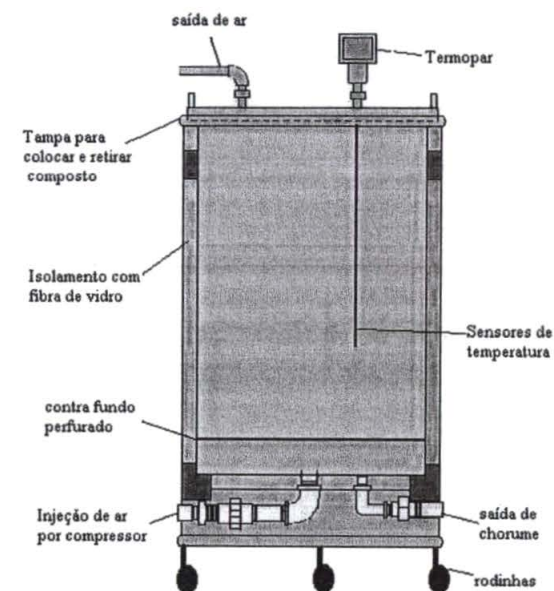
Basicamente existem dois processos de compostagem: os SISTEMAS COM REATORES E SEM REATORES. A decisão pela utilização de alguns destes sistemas deve considerar a variabilidade dos substratos, condições do tempo, espaço disponível, proximidade de residências, escala desejada e a disponibilidade de recursos.

Os sistemas com reatores são aqueles em que o material a ser compostado é colocado em reatores, também denominados digestores (que podem ser de vários tipos como por exemplo Dano, Kneer). Estes sistemas possuem as seguintes vantagens:

- reduzida duração da fase termófila;
- produto final com maior segurança sanitária;
- tempo de compostagem menor.

A desvantagem destes sistemas é o custo elevado da instalação.

Na compostagem em reator, o operador pode ter maior controle dos parâmetros importantes na velocidade de compostagem, tais como umidade, temperatura e aeração, podendo-se utilizar reatores em pequenas e grandes escalas. Para exemplificar, o Esquema 1 e a Figura 1 mostram dois reatores utilizados em pesquisas na Universidade Federal do Paraná - UFPR. O primeiro é um pequeno reator em escala laboratorial de 50 kg e o segundo em escala piloto de 13 toneladas (processo Kneer) de propriedade da Tibagi Projetos Ambientais, em São José dos Pinhais, PR.



Esquema 1 - Reator em escala de laboratório.

Após a saída do reator, geralmente o material em processo de compostagem segue para o pátio de cura onde a fase de maturação do composto é realizada.

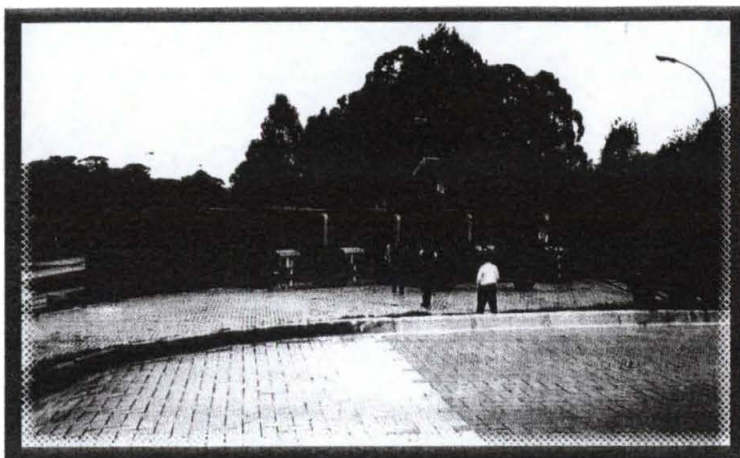


Figura 1. Reator tipo Kneer em escala piloto.

Os sistemas sem reator não utilizam o digestor, como por exemplo leiras reviradas (widrow) e pilha estática aerada.

A compostagem de leiras reviradas é mais simples de ser operada e implantada, porém apresenta homogeneização menos eficiente e tempo maior de fase termófila em comparação com o sistema que utiliza reatores. Para a montagem da leira de compostagem, recomenda-se um tamanho aproximado de 1 a 2 m de altura e 2 a 5 m de largura e comprimento variável, de formato triangular ou trapezoidal. Preferencialmente, deve-se montar a leira sobre galhos e gravetos para facilitar a aeração. Em lugares onde não há equipamento para homogeneizar os materiais a serem compostados (lodo, esterco, resíduo de galhos, serragem), pode-se utilizar o método "indore", no qual se dispõe camadas alternadas de 15 cm do resíduo rico em C seguido de uma camada de 5 cm de inóculo (estercos, lodos, etc) até atingir a altura desejada. Deve-se revirar a leira continuamente para arejar e homogeneizar eficientemente, além de controlar a umidade.

No sistema de pilha estática aerada não é necessário o revolvimento periódico, sendo somente a leira montada sobre tubos perfurados, sendo a aeração forçada sob a pilha (Figura 2). Como na compostagem em leiras, o tamanho e a quantidade dos materiais devem ser controlados para manter a porosidade da pilha, assegurando o fluxo adequado do ar.



Figura 2 - Pilha estática aerada em escala piloto.

Para a escolha da melhor opção entre as diversas possibilidades e formas de realizar a compostagem, deve-se observar as vantagens e desvantagens de cada sistema para obtenção do produto final desejado com o melhor custo/benefício.

7 - A compostagem da serragem

A SERRAGEM pode ser usada como fertilizante orgânico e seus nutrientes podem ser reciclados através do sistema solo-planta. Porém, a aplicação direta de materiais lignocelulósicos no solo pode apresentar algumas desvantagens tais como fitotoxicidade, imobilização de nutrientes e concentração de sais desequilibrada. O uso da serragem como condicionador de solos é limitado pela lentidão com que este material é degradado em condições naturais e a relativa estabilidade estrutural dos componentes da madeira, como a lignina e a celulose. O baixo teor de N nas estruturas químicas da serragem e a conseqüente relação C/N muito alta é desfavorável em termos microbiológicos e levam à necessidade de se adicionar outros materiais ricos em N à serragem para facilitar sua biodegradação. A compostagem é a alternativa mais indicada para tratar a serragem estocada e já em algum estágio de decomposição. A Tabela 1 apresenta os valores de C total e N (determinado pelo método de Kjehdal) de diferentes amostras de serragens do Paraná.

Tabela 1 - Teores de C total e N de algumas amostras de serragens:

Propriedade	C(%)	N(mg/kg)	C/N	Umidade a 65C ^a
Pinus 3 meses	14,87	1,24	119,92	68,80
Pinus nova	22,10	1,24	178,23	52,67
Pinus 6 meses	16,73	1,17	142,99	64,16
Imbuia	16,38	4,08	40,15	66,83
Pinus 3 a 4 meses	9,11	1,09	83,58	80,29
Pinus nova	18,98	1,02	186,08	60,67
Pinus nova	15,75	1,17	134,62	66,66
Pinus 2 a 3 meses	19,54	1,38	141,59	59,06
Pinus 6 meses	14,07	1,31	107,40	66,34

A adição de uma fonte de nitrogênio e de agentes microbianos ligno-celulolíticos à serragem visa aumentar a velocidade de sua decomposição. O LODO dos rejeitos de fábricas de papel e celulose é um material adequado para suprir as necessidades de nitrogênio nos processos biológicos de transformação da serragem. Esses lodos, conhecidos como lodos biológicos, advêm de lagoas de transformação e decantação de efluentes, onde são tratados com fertilizantes contendo nitrogênio e fósforo antes de serem descartados. Uma análise de fertilidade de um lodo biológico de fábrica de papel e celulose apresentou os seguintes resultados:

PH CaCl ₂	K ⁺ g/kg	Ca ²⁺ cmol/dm ³	Ca ²⁺ +Mg ²⁺ cmol/dm ³	N total [*] g/100g	H ⁺ +Al ³⁺ cmol/dm ³	MO g/kg	P mg/kg	Na ⁺ mg/kg
5,76	1,66	9,70	11,70	0,87	3,68	105,19	567	690

* Análise feita no TECPAR.

Dada a importância da MON e a gravidade dos problemas ambientais decorrentes do acúmulo de resíduos orgânicos nas indústrias florestais, torna-se cada vez maior o interesse em reciclá-los como fertilizantes ou condicionadores de solo.

A compostagem da serragem de Pinus taeda com lodo biológico de fábrica de celulose, misturados em volumes iguais (1:1), foi estudada por alunos de pós-graduação do Departamento de Química da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, em um projeto financiado pelo PROGRAMA PARANÁ 12 MESES. Neste estudo foi utilizado reator fechado de 13 t sob regime de aeração e controle de temperatura. A compostagem durou 30 dias e produziu um composto de alta qualidade que foi testado com sucesso nos viveiros de produção de mudas de Pinus e Eucalyptus da Embrapa Florestas, em Colombo/PR. O composto produzido neste estudo apresentou as seguintes características químicas:

Caracterização química do composto serragem - lodo

Amostra	pH	cmol/dm ³				g/dm ³		mg/dm ³		g/100g	
		CaCl ₂	K ⁺	Ca ²⁺	Ca ²⁺ +Mg ²⁺	H ⁺ +Al ³⁺	M.O	P	Na ⁺	C%	NT%
Composto	5.10	0.41	5.59	9.15	4.61	640.0	548.0	107	35.75	10.57	
Solo	5.60	0.09	6.73	11.75	4.28	67.0	14.4	04	3.80	1.82	
Substrato*	5.52	1.87	25.77	37.03	3.69	214.0	858.0	68	11.90	2.76	
Vermiculita	5.95	0.32	0.94	7.35	1.45	117.0	1.0	06	6.50	—	

* Substrato utilizado regularmente no viveiro

Laboratório de Solos e Nutrição Florestal Embrapa Florestas (03/09/2001)

Este trabalho demonstrou que o processo Kneer, usado para a preparação do composto foi eficiente para a transformação de resíduos serragem e lodo, em material fertilizante orgânico, em curto espaço de tempo (30 dias), com perspectivas de aplicação agrícola.



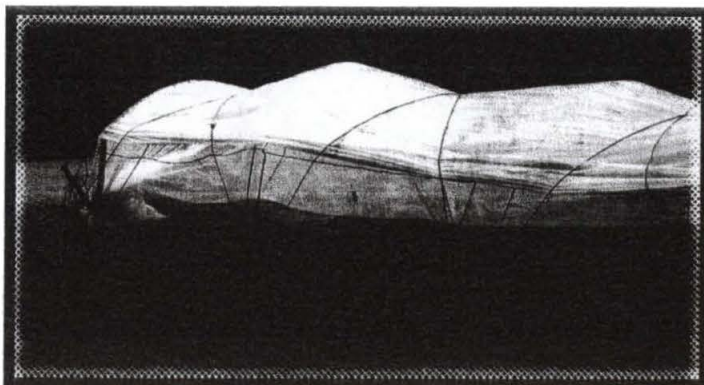
Entre os diferentes aspectos químicos estudados foi demonstrado que:

- existe correlação entre a curva de temperatura do processo e o teor de radicais livres do tipo orto-semiquinonas, estruturas responsáveis pela capacidade de complexação com metais como zinco, cobre, manganês e ferro, micronutrientes importantes à nutrição vegetal; mostrou ainda que íons ferro (Fe³⁺), inicialmente na fase inorgânica do material sendo compostado, passam para a fase orgânica com o desenvolvimento do processo.
- as razões H/C e N/C mais elevadas que na média dos AH de solos, indicando que durante a compostagem a MON tornou-se mais alifática e rica em funções nitrogenadas;
- as razões O/C aumentam e diminuem de valor no decorrer do processo de compostagem, indicando processos oxidativos, no início, e de redução, no final, evidenciando a importância da aeração nas fases iniciais do processo.

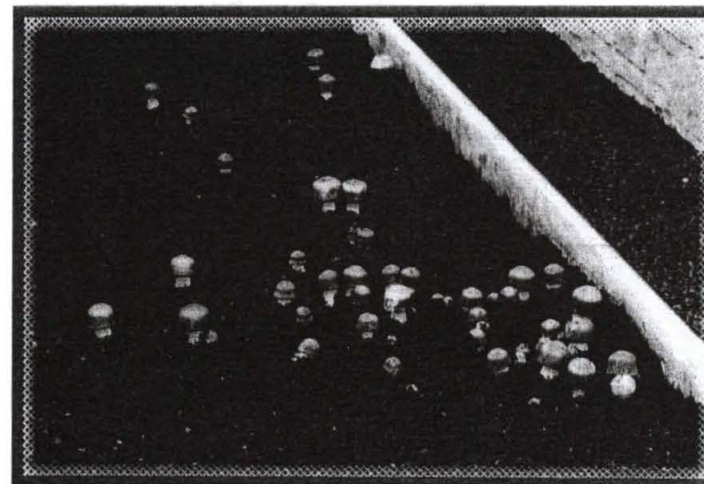
8 - Usos do composto e produtos comerciais

Diversos usos podem ser dados ao composto e a finalidade pode influenciar e ajudar na escolha do tipo de planta de compostagem que se deseja e o custo que pode estar envolvido em sua implantação. O composto pode ser comercializado como:

- fertilizante orgânico a granel - geralmente destina-se à olericultura, fruticultura, floricultura e paisagismo de larga escala;
- fertilizante orgânico ensacado - destinado à floricultura doméstica ou em pequena escala, esse produto é geralmente comercializado em supermercados e casas especializadas;
- composto para produção de substratos de mudas florestais - neste caso o composto é diluído com outros componentes tais como solo, casca de árvores ou de cereais, para propiciar uma boa textura e granulometria;



- húmus de minhoca - aqui a compostagem é feita através de ação de minhocas e gera um húmus de alta qualidade e valor econômico. Geralmente o produto é comercializado ensacado.
- composto para cultivo de cogumelos - este tipo de composto possui características químicas apropriadas para o cultivo da espécie de interesse, geralmente cogumelos do gênero *Agaricus*. O mercado para este produto é restrito e localizado e merece um estudo econômico prévio;



- composto para uso florestal - geralmente esta atividade está associada às empresas florestais e a proximidade à área de plantio é fundamental à viabilidade econômica da atividade, pois os custos de frete e transporte costumam ser muito altos.

8 - Conclusões

A compostagem é uma das alternativas mais eficientes para o tratamento de resíduos lignocelulósicos, como a serragem tanto sob o ponto de vista econômico, como ambiental, uma vez que a reciclagem de resíduos orgânicos tem grandes implicações no manejo de solos e do ambiente, com aplicações diretas em tecnologias de recuperação de solos contaminados com pesticidas ou outros resíduos orgânicos tóxicos, de minimização de riscos de erosão e de desertificação de solos, de controle de emissão de CO₂ através do uso de húmus mais estáveis e ainda de manejo de nutrientes, uma vez que as substâncias húmicas, quando associadas a fertilizantes químicos inorgânicos, podem servir como fertilizantes de liberação controlada, resultando em economia de recursos e menor impacto negativo no ambiente.

Referências bibliográficas

- 1) BUDZIAK, C.R. Grupos ácidos e capacidade de oxidação de ácidos húmicos como método de avaliação de processos de compostagem. Curitiba .2002. p.73. Dissertação de Mestrado (Química Inorgânica) - Setor de Ciências Exatas, UFPR.
- 2) GOMEZ, A., The evaluation of compost quality, Trends in analytical chemistry, vol. 17, no. 5, 1998.
- 3) HAUG, R. T. Compost Engineering Principles e Practice. Michigan USA, 1980. Ann Arbor Science, 1980
- 4) KIEHL, E.J. Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. Piracicaba SP, 1998. p 1-56.
- 5) LYNCH, N.J.; CHERRY, R.S. Design of passively aerated compost piles: vertical air velocities between the pipes. Biotechnol. Prog. 1996, 12, 624-629
- 6) MAIA, C.M.B.F., Acompanhamento do processo de compostagem da serragem de pinus taeda pelas características químicas e espectroscópicas das substâncias húmicas em formação, Tese de Doutorado, (Química Orgânica) - Setor de Ciências Exatas, UFPR, em andamento.
- 7) MAIA, C.M.B.F., MANGRICH, A.S., BUDZIAK, C.R., SANTOS, J.C.P. Spectroscopic and chemical characterization of humic structures through composting advance of sawdust/paper mill sludge. Anais do 11º IHSS Meeting, 2002,.
- 8) PAIXÃO, R.E. Avaliação química e espectroscópica do grau de maturidade do composto de podas e lodo de esgoto industrial . Curitiba 2003. Dissertação de Mestrado (Química Analítica) setor de Ciências exatas, UFPR.
- 9) PEIXOTO, R.T.G. Compostagem Opção para o manejo orgânico do solo. Londrina PR. IAPAR, 1988. p 14.
- 10) PEREIRA NETO, J.T. Manual de Compostagem, UNICEF, Belo Horizonte, 56 p, 1996.
- 11) TOMASELLI, I. Resíduos da indústria de processamento primário: uma oportunidade. In: WORKSHOP SUL AMERICANO SOBRE USOS ALTERNATIVOS DE RESÍDUOS DE ORIGEM FLORESTAL E URBANA, 1997, Curitiba., conferência não publicada.